

Untersuchungen zu funktionell konservierten sowie divergenten Mechanismen des Segmentierungsprozesses der Arthropoden am Beispiel der Spinne *Cupiennius salei*

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades an  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Michael Schoppmeier  
aus Köln

Köln, 2003

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Diethard Tautz
  2. Berichterstatter: Prof. Dr. Siegfried Roth
- Tag der mündlichen Prüfung: 01.12.2003



## Inhaltsverzeichnis:

Danksagung

Abkürzungsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Segmentierungsmechanismen bei Arthropoden	2
1.1.1 Paar-Regel und Gap Gen Mechanismen in Insekten	3
1.1.2 Paar-Regel und Gap Gen Mechanismen anderer Arthropoden	5
1.2 Anneliden Segmentierung	6
1.3 Vertebraten Somitogenese	7
1.4 Ziele der Arbeit	11
 <b>2. Methoden</b>	 <b>12</b>
2.1 . Molekulare Methoden	12
2.1.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	12
2.1.2 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) PCR	12
2.1.3 Erstellen einer <i>Cupiennius salei</i> genomischen Lambda Bibliothek	13
2.1.4 Isolierung genomischer Klone	13
2.1.5 Enzymatische Sequenzierung	14
2.1.6 Synthese von Doppelstrang (ds)- RNA	14
2.2 Embryologische Methoden	15
2.2.1 Das Versuchstier	15
2.2.2 Entnahme und Fixierung der Embryonen	15
2.2.3 Injektionen von ds-RNA	16
2.2.4 In-situ-Hybridisierungen und DAPI Färbungen	16
2.2.5 Antikörper Färbungen	16
 <b>3. Ergebnisse</b>	 <b>17</b>
3.1 Das <i>Cupiennius salei pairberry-3 (pby-3)</i> Gen	17
3.1.1 Die dynamische und segmentale Expression von <i>pby-3</i>	18
3.1.2 Segmente werden einzeln von der Wachstumszone abgespalten	27
3.1.3 Zellteilungsmuster in der Wachstumszone sind nicht reproduzierbar	27
3.1.4 Paar-Regel Gen RNAi ergibt keine Segmentierungsdefekte	31
 3.2 Die <i>Cupiennius salei hairy</i> cis-regulatorische Region	 32
3.2.1 Klonieren und Analyse von <i>hairy</i> regulatorischen Sequenzen	32

3.3 Die <i>Cupiennius salei</i> Krüppel-1 ( <i>Kr-1</i> ) und Krüppel-2 ( <i>Kr-2</i> ) Gene	35
3.3.1 Die <i>Kr-1</i> Expression in der Wachstumszone und im Neuroektoderm	36
3.3.2 <i>Kr-1</i> RNAi führt zum Abbruch des Segmentierungsprozesses	39
3.3.3 Die dynamische <i>hairy</i> Expression in schwächeren <i>Kr-1</i> RNAi Phenotypen ist nicht verändert	45
3.3.4 Die <i>Kr-2</i> Expression im Keimblatt und im Neuroektoderm	48
3.3.5 <i>Kr-2</i> RNAi resultiert nicht in Segmentierungsphenotypen	48
3.4 Die <i>Cupiennius salei</i> Gene <i>Notch</i> ( <i>N</i> ), <i>Delta-1</i> ( <i>Dl-1</i> ) und <i>Delta-2</i> ( <i>Dl-2</i> )	53
3.4.1 Die Expression von <i>Notch</i> , <i>Dl-1</i> und <i>Dl-2</i> in den Segmenten und der Wachstumszone	53
3.4.2 <i>Notch</i> , <i>Dl-1</i> und <i>Dl-2</i> RNAi führen zu identischen Segmentierungsdefekten	57
3.4.3 Die <i>hairy</i> Expression ist in <i>Notch</i> , <i>Dl-1</i> und <i>Dl-2</i> RNAi Embryonen gestört	62
3.5 Das <i>Cupiennius salei</i> Suppressor of Hairless ( <i>Su(H)</i> ) Gen	67
3.5.1 Die frühe Expression von <i>Su(H)</i> ist ubiquitär	68
3.5.2 <i>Su(H)</i> RNAi führt zu schweren Segmentierungsdefekten	68
3.5.3 <i>Su(H)</i> RNAi führt zur Desorganisation des <i>Delta-1</i> Musters	74
3.6 Das <i>Cupiennius salei</i> Fringe ( <i>Fng</i> ) Gen	74
3.6.1 Die Expression von <i>Fringe</i> korreliert mit der Bildung von Segmentgrenzen	75
3.6.2 <i>Fng</i> RNAi führt zu Segmentierungsphenotypen	78
3.6.3 <i>Fng</i> ist notwendig zur Organisation des <i>Delta-1</i> Musters	79
<b>4. Diskussion</b>	<b>84</b>
4.1 Ist die Ebene der Paar-Regel Gene konserviert?	84
4.2 Ist die Ebene der Gap Gene konserviert?	91
4.3 Die Notch-Signalkaskade ist am Segmentierungsprozess der Spinne beteiligt	95
4.4 Gibt es einen gemeinsamen Ursprung des Segmentierungsprozesses?	102
<b>5. Literaturverzeichnis</b>	<b>105</b>
<b>6. Anhang</b>	<b>114</b>
Zusammenfassung	129
Summary	130
Erklärung	131
Lebenslauf	132

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Diethard Tautz am Institut für Genetik der Universität zu Köln angefertigt.

Vor allem möchte ich Herrn Prof. Dr. Diethard Tautz und meinem Betreuer Herrn Dr. Wim Damen für die umfassende Unterstützung, die Diskussionsbereitschaft und für die gewährte Freiheit bei der Planung von Experimenten danken.

Den Mitgliedern der Abteilung für Evolutionsgenetik danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung meiner Experimente und für viele kritische Diskussionen. Besonders hervorzuheben sind hier Nikola-Michael Prpic, Ralf Janßen und Gregor von Levetzow. Vielen Dank für die Gute Atmosphäre im Spider-Lab.

Dr. Angelika Stollewerk danke ich für viele Diskussionen während ungezählter Tassen Kaffee und für die Überlassung einer Abbildung.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Thomas Klein und seiner Arbeitsgruppe für die Diskussionsbereitschaft und dem Interesse an meiner Arbeit. Bei Prof. Dr. Maria Leptin und Dr. Frank Sprenger für die Nutzung ihrer Ressourcen (und die Rettung meiner Festplatte!).

Für die Durchsicht des Manuskripts danke ich Dr. Wim Damen, Nikola-Michael Prpic und Jutta Schoppmeier.

Zum Schluss die wichtigsten Menschen: Dank an meine Familie und Jutta, für ihr Verständnis, die konstante Unterstützung und Aufmunterung, das alles ist unersetzbar!

**Abkürzungsverzeichnis:**

aa	Aminosäure
Abb.	Abbildung
bp	Basenpaar
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
Ch	Cheliceren
DAPI	4',6'-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
ds-RNA	Doppelstrang-Ribonukleinsäure
GSP	Gen spezifischer Primer
h	Stunde
L	Labrum
L1-L4	Laufbeine
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
ng	Nanogramm
O	opisthosomales Segment
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pfu	plaque forming unit
Pp	Pedipalpen
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
ss-RNA	Einzelstrang-Ribonukleinsäure
U	Unit
vgl.	Vergleiche
z. B.	zum Beispiel
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{M}$	Mikromolar

**Abbildungsverzeichnis:**

<b>Abb. 1:</b> Sequenzvergleich verschiedener Pax III Gruppen Proteine	17
<b>Abb. 2:</b> Die segmentale <i>pbv-3</i> Expression in älteren Stadien	20
<b>Abb. 3:</b> Die dynamische <i>pbv-3</i> Expression	20
<b>Abb. 4:</b> Schematische Darstellung der dynamischen <i>pairberry-3</i> Expression	23
<b>Abb. 5:</b> Statistische Auswertung der dynamischen <i>pbv-3</i> Expression	24
<b>Abb. 6:</b> Der Vergleich der <i>pbv-3</i> Expression mit der schematischen Abbildung	26
<b>Abb. 7:</b> Es ist keine Spaltung der <i>pbv-3</i> Expressionsdomänen erkennbar	26
<b>Abb. 8:</b> Schematische Darstellung der vollständigen dynamischen <i>pbv-3</i> Expression	28
<b>Abb. 9:</b> Die Zellteilungsmuster der Wachstumszone erscheinen ungeordnet	30
<b>Abb. 10:</b> Schematische Darstellung des genomischen <i>hairy</i> Klons	34
<b>Abb. 11:</b> Sequenzvergleich der fünf C2H2 Zink-Finger verschiedener Krüppel Proteine	36
<b>Abb. 12:</b> Die <i>Krüppel-1</i> Expression in verschiedenen Stadien der Entwicklung	38
<b>Abb. 13:</b> <i>Krüppel-1</i> RNAi führt zum Abbruch des Segmentierungsprozesses	42
<b>Abb. 14:</b> Die Expression von <i>engrailed</i> ist in <i>Kr-1</i> RNAi Embryonen gestört	44
<b>Abb. 15:</b> Die Wachstumszonen von <i>Kr-1</i> RNAi Embryonen lösen sich von posterior her auf	44
<b>Abb. 16:</b> Die <i>hairy</i> Expression bei Embryonen mit schwächeren <i>Kr-1</i> RNAi Phänotypen ist nicht verändert	47
<b>Abb. 17:</b> Die Expression von <i>Kr-2</i> in verschiedenen Stadien der Entwicklung	50
<b>Abb. 18:</b> <i>Kr-2</i> RNAi resultiert in der Reduktion der <i>Kr-2</i> Expression	52
<b>Abb. 19:</b> Die Expression von <i>Notch</i> , <i>Delta-1</i> und <i>Delta-2</i>	56
<b>Abb. 20:</b> <i>Notch</i> , <i>Delta-1</i> und <i>Delta-2</i> RNAi führen zu identischen Segmentierungsphänotypen	59
<b>Abb. 21:</b> Die Zellteilungsmuster in den Wachstumszonen von <i>Notch</i> , <i>Dl-1</i> und <i>Dl-2</i> RNAi Embryonen unterscheiden sich nicht von denen der Kontrollembryonen	61
<b>Abb. 22:</b> Die dynamische Expression von <i>hairy</i> ist in <i>Notch</i> und <i>Delta</i> RNAi Embryonen gestört	64
<b>Abb. 23:</b> Die Expression von <i>even-skipped</i> ist in <i>Notch</i> und <i>Delta</i> RNAi Embryonen nicht gestört	66
<b>Abb. 24:</b> Sequenzvergleich verschiedener Su(H) Proteine	67
<b>Abb. 25:</b> Die Expression von <i>Su(H)</i> ist ubiquitär	71
<b>Abb. 26:</b> <i>Su(H)</i> RNAi führt zu starken Segmentierungsdefekten	71

<b>Abb. 27:</b> Die Expression von <i>Dl-1</i> ist in <i>Su(H)</i> RNAi Embryonen gestört	73
<b>Abb. 28:</b> Sequenzvergleich verschiedener Fringe Proteine	75
<b>Abb. 29:</b> Die Expression von <i>Fringe</i>	77
<b>Abb. 30:</b> <i>Fringe</i> RNAi führt zu Segmentierungsdefekten	81
<b>Abb. 31:</b> Die Expression von <i>Dl-1</i> ist bei <i>Fng</i> RNAi Embryonen gestört	83

### **Tabellenverzeichnis:**

<b>Tabelle 1:</b> <i>Krüppel-1</i> RNAi verursacht Segmentierungsdefekte	40
<b>Tabelle 2:</b> <i>Notch</i> , <i>Delta-1</i> und <i>Delta-2</i> RNAi führen zu Segmentierungsdefekten	57
<b>Tabelle 3:</b> <i>Suppressor of Hairless</i> RNAi verursacht Segmentierungsdefekte	69
<b>Tabelle 4:</b> <i>Fng</i> RNAi verursacht Segmentierungsdefekte	78

## 1. Einleitung

Die Frage nach dem Ursprung des Segmentierungsprozesses gehört zu den fundamentalen Problemen der Evolutionsbiologie. Allein bei der Definition eines Segmentes und der Frage welche Organismen als „segmentiert“ zu bezeichnen sind, herrscht Uneinigkeit (zur aktuellen Übersicht: Davis und Patel 1999, Budd 2001, Minelli 2001, Scholtz 2002). Dennoch ist allgemein akzeptiert, dass die Einteilung der Körperachse in sich wiederholende Einheiten bei Arthropoden, Anneliden und Vertebraten eine Art basale Definition der Segmentierung darstellt (Davis und Patel 1999). Nur eine solch relativ einfache Definition schafft die Basis für einen Vergleich der unterschiedlichen Segmentierungsprozesse, da zwischen den genannten Gruppen offensichtlich große morphologische Unterschiede bestehen.

Um aber Hypothesen über den Ursprung des Segmentierungsprozesses aufstellen zu können, muss zunächst die phylogenetische Beziehung zwischen Arthropoden, Anneliden und Vertebraten erörtert werden. Dieses betrifft in erster Linie Arthropoden und Anneliden, die unter anderem aufgrund ihrer Segmentierung traditionell als Artikulata zusammengefasst wurden (zur Übersicht: Scholtz 2002). Die zurzeit akzeptierte Phylogenie der Metazoa unterstützt diese Einteilung nicht mehr. Vielmehr gibt es nun eine tiefe Trennung von Anneliden und Arthropoden, was zur Folge hat, dass diese segmentierten Phyla mehreren nicht-segmentierten Phyla näher stehen (Aguinaldo et al. 1997, de Rosa et al. 1999). Hieraus ergeben sich drei Szenarien für die Evolution des Segmentierungsprozesses (Davis und Patel 1999). Zunächst könnte die Segmentierung bei Arthropoden, Anneliden und Vertebraten unabhängig voneinander entstanden sein, wobei dann Unterschiede im Segmentierungsprozess dieser drei Phyla zu erwarten wären. Aber auch ein gemeinsamer Ursprung im Falle der Arthropoden und Anneliden wäre möglich, wie auch ein gemeinsamer segmentierter Vorfahre für alle drei Phyla. In diesem Fall würde man erwarten, dass signifikante Gemeinsamkeiten im Segmentierungsprozess auftreten.

Die Frage nach dem Ursprung des Segmentierungsprozesses kann also über den Vergleich der Segmentierungsmechanismen von Arthropoden, Anneliden und Vertebraten untersucht werden. Allerdings unterscheiden sich die Entwicklungsmechanismen bereits innerhalb der Arthropoden, sodass ein genereller Vergleich mit Anneliden oder Vertebraten schwierig ist (Davis und Patel 1999). Somit ist es zunächst notwendig verschiedene Aspekte der Arthro-

poden Entwicklung zu studieren, um so einen Vergleich mit anderen segmentierten Phyla durchführen zu können. Hier bieten sich die Cheliceraten, eine basale Arthropoden-Gruppe, an.

Die Cheliceraten bilden eine monophyletische Arthropoden-Gruppe, deren Stammeslinie bis in das Kambrium reicht. Ein Vergleich molekularer Segmentierungsmechanismen zwischen Cheliceraten und anderen Arthropoden kann konservierte sowie divergente Prozesse der Arthropoden-Entwicklung aufzeigen. Solch ein Vergleich könnte es erlauben, den molekularen Archetyp der Arthropoden zu definieren und somit auch einen Vergleich mit anderen segmentierten Phyla ermöglichen.

In dieser Arbeit sollen verschieden Aspekte der Segmentierung des Cheliceraten *Cupiennius salei*, einer Kammspinne, analysiert werden, um so mögliche Rückschlüsse auf die Evolution des Segmentierungsprozesses ziehen zu können (vgl. 1.4 Ziele der Arbeit).

## **1.1 Segmentierungsmechanismen bei Arthropoden**

Die meisten Informationen über die molekularen Segmentierungsmechanismen liegen für *Drosophila melanogaster* vor. Der Segmentierungsprozess wird hier über eine hierarchisch organisierte Kaskade kontrolliert, wobei die schrittweise molekulare Einteilung des Embryos schließlich in der Bildung der Segmente resultiert (zur Übersicht: Ingham 1988, St. Johnston und Nüsslein-Volhard 1992, Pankratz und Jäckle 1993). Diese Kaskade umfasst maternal ausgeprägte Gene, die über Gradienten entlang der anterior-posterior Achse die Expression der zygotischen Gap Gene regulieren. Die Gap Gene wiederum steuern, gemeinsam mit den maternalen Genen, die Expression der Paar-Regel Gene, welche in einem doppelsegmentalen Muster ausgeprägt werden und alternierende Segmente spezifizieren. Paar-Regel und auch Gap Gene regulieren die Aktivität der Segment-Polaritäts Gene, die an der Bildung der segmentalen Grenzen beteiligt sind.

Doch besteht die Aufgabe der Segmentierungsgene zumeist nicht nur in der Etablierung der Körperachse, vielmehr treten auch weitere Funktionen, wie z. B. während der Neurogenese auf (Ingham 1988).

In *Drosophila* ist die Bildung von Gradienten, über verschiedene Distanzen, essentiell für die Funktion der Segmentierungskaskade. Diese Formation von Gradienten ist dadurch



möglich, dass der frühe Embryo nicht zellularisiert vorliegt und so die Transkriptionsfaktoren frei diffundieren können (Driever und Nüsslein-Volhard 1988a, b; Hülskamp et al. 1990, Klingler und Tautz 1999). In anderen Arthropoden, den Kurzkeim-Insekten, Crustaceen, Myriapoden und Cheliceraten ist das nicht der Fall. Hier entstehen, wenn überhaupt, nur wenige Segmente in syncytialen Stadien, vielmehr erfolgt die Addition von Segmenten ausgehend von einer zellulären Umgebung (Sander 1976, Tautz et al. 1994, Tautz und Sommer 1995, Davis und Patel 1999, 2002).

Es stellt sich nun die Frage, inwieweit die *Drosophila* Segmentierungskaskade in anderen Arthropoden konserviert ist. Die meisten Informationen liegen dabei für die Segment-Polaritäts Gene vor. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass nicht nur diese Ebene der Kaskade konserviert ist, sondern auch die Organisation des Arthropoden Embryos in Parasegmenten (Patel 1994, Damen 2002a, Hughes und Kaufmann 2002b). Für die Ebene der Paar-Regel und Gap Gene liegen allerdings weniger genaue Erkenntnisse vor, welche im Folgenden zusammengefasst werden sollen.

### 1.1.1 Paar-Regel und Gap Gen Mechanismen in Insekten

Die Paar-Regel Gene sind die ersten periodisch ausgeprägten Gene der *Drosophila* Segmentierungskaskade. Der Name Paar-Regel leitet sich von Mutationen ab, die zur Deletion alternierender Segmente führen (Nüsslein-Volhard und Wieschaus 1980).

Außerhalb von *Drosophila* wurde der Paar-Regel Mechanismus in verschiedenen Insekten analysiert (zur Übersicht: Davis und Patel 2002). So wurden beim Mehlkäfer *Tribolium castaneum* diverse Paar-Regel Gene kloniert, die scheinbar in einem doppelsegmentalen Muster ausgeprägt werden (Sommer und Tautz 1993, Patel et al. 1994, Brown und Denell 1996). Den endgültigen Nachweis, dass es bei *Tribolium* einen Paar-Regel Mechanismus gibt, erbrachten Maderspacher et al. (1998) durch einen Mutagenese Ansatz. Hier waren Mutanten zu beobachten, bei denen alternierende Segmente deletiert waren, also ein klarer Paar-Regel Phenotyp auftrat. Zudem konnte durch die Eliminierung des *even-skipped* Proteins (EVE) die Paar-Regel Funktion von *eve* nachgewiesen werden (Schröder et al. 1999). Allerdings scheinen nicht alle aus *Drosophila* bekannten Paar-Regel Gene diese Funktion auch in *Tribolium* auszuüben. So wird das Gen *fushi tarazu* (*ftz*) zwar auch in Streifen ausgeprägt, jedoch erbrachte die Deletion des Hox Komplexes, in welchem *ftz* liegt, keine

erkennbaren Segmentierungsphenotypen (Stuart et al. 1991, Brown et al. 1994). Auch bei *Schistocerca americana*, dem Grashüpfer, scheint *ftz* keine Paar-Regel Funktion zu haben, wie dieses wohl auch für *eve* der Fall ist (Patel et al. 1992, Dawes et al. 1994). Beide Gene werden in posterioren Domänen ausgeprägt, was vermuten lässt, dass sie trotzdem eine Rolle während der Segmentierung des Grashüpfers spielen.

Einen Hinweis auf einen möglichen Paar-Regel Mechanismus bei *Schistocerca* ergab die Analyse des *paired* Homologes *pairberry-1* (*pby-1*) (Davis et al. 2001). Dieses Gen wird transient in einem doppelsegmentalen Muster ausgeprägt, welches dann in eine segmentale Expression übergeht.

Es gibt also Anhaltspunkte, dass der Paar-Regel Mechanismus bei den Insekten konserviert ist, auch wenn nicht alle aus *Drosophila* bekannten Gene eine Paar-Regel Funktion ausüben. Betrachtet man nun die nächste Ebene, die der Gap Gene, fallen die Informationen spärlicher aus. Im *Drosophila* Blastoderm werden die Gap Gene in breiten Domänen ausgeprägt (Ingham 1988, St. Johnston und Nüsslein-Volhard 1992, Pankratz und Jäckle 1993) wobei Mutationen zur Deletion dieser Bereiche des Embryos führen (Nüsslein-Volhard und Wieschaus 1980).

Im Fall anderer Insekten liegen vor allem Daten für die Gene *Krüppel* (*Kr*) und *hunchback* (*hb*) vor (Sommer und Tautz 1991, 1993; Sommer et al. 1992, Wolff et al. 1995, Rohr et al. 1999, Patel et al. 2001). So wird z. B. *Krüppel* in *Drosophila*, der Stubenfliege *Musca domestica* und der Mücke *Clogmia albipunctata* in einer vergleichbaren, zentralen Domäne ausgeprägt (Sommer und Tautz 1991, Rohr et al. 1999). Aber auch die Expression bei *Tribolium* scheint vergleichbar zu der von *Drosophila* zu sein. Zwar kann im Blastodermstadium zunächst eine posteriore Domäne beobachtet werden, doch bleibt das Muster in den entstehenden Segmenten stabil und verschiebt sich mit diesen Segmenten in eine ebenfalls zentrale Position. Der Unterschied zu *Drosophila*, *Musca* oder *Clogmia* ergibt sich also aus der Kurzkeimentwicklung von *Tribolium* (Sommer und Tautz 1993).

Auch die Ausprägung von *hb* z. B. in *Tribolium* und *Schistocerca* lässt vermuten, dass die Segmentierungsfunktion konserviert ist, obwohl im Falle von *Tribolium* auch deutlich wurde, dass regulatorische Unterschiede auftreten (Wolff et al. 1995, 1998, Patel et al. 2001, Schröder 2003).

Die Expressionsmuster der Gap Gene lassen also auf konservierte Funktionen während der frühen Insekten Entwicklung schließen. Dieses wird auch durch funktionelle Daten aus

*Drosophila* und *Tribolium* belegt. So liegen in Fall von *Tribolium* z. B. Mutanten, aber auch RNAi Phenotypen vor, die den klassischen Gap-Phenotyp aufweisen (Maderspacher et al. 1998, Schröder 2003).

### 1.1.2 Paar-Regel und Gap Gen Mechanismen anderer Arthropoden

Im Fall der Insekten gibt es keine Zweifel mehr, dass ein doppelsegmentaler Paar-Regel Mechanismus existiert. Doch wie sieht die Situation bei Cheliceraten, Myriapoden und Crustaceen aus? Ein recht gut untersuchtes Gen ist auch hier *fushi tarazu* (*ftz*). Die Expression dieses Gens wurde bislang bei dem Chelicerat *Archezogetes longisetosus*, dem Myriapod *Lithobius atkinsoni* und bei *Sacculina carcini*, einem Crustaceen analysiert (Telford 2000, Hughes und Kaufmann 2002a, Mouchel-Vielh et al. 2002). Dabei zeigte sich, dass im Gegensatz zu den Insekten, *ftz* in Cheliceraten und Crustaceen nicht in Streifen, sondern in Hox Gen ähnlichen Domänen ausgeprägt wird. In Myriapoden kann neben dieser Domäne auch noch eine transiente segmentale Expression beobachtet werden. Die Expression von *ftz* in einer Hox Domäne scheint also evolutionär älter als das Streifen-Muster zu sein. Im Verlauf der Arthropoden Evolution hat *ftz* dann neue Funktionen während des Segmentierungsprozesse übernommen (Telford 2000, Damen 2002b).

Für die Spinne *Cupiennius salei* wurden bislang die primären Paar-Regel Gen Homologe *hairy*, *even-skipped* und *runt* beschrieben (Damen et al. 2000). Diese Gene werden in einem dynamischen Muster innerhalb der Wachstumszone, dem Bereich aus dem die Segmente entstehen, ausgeprägt. Dieses lässt zwar auf eine Funktion während der Segmentierung der Spinne schließen, doch konnte bisher der genaue Mechanismus nicht bestimmt werden. Allerdings gibt es auch bei Cheliceraten einen Hinweis auf einen doppelsegmentalen Mechanismus (Dearden et al. 2002). Die Autoren beschreiben die Expression von *Tu-pax3/7*, einem *paired* ähnlichen Gen der Milbe *Tetranychus urticae*. *Tu-pax3/7* wird segmental ausgeprägt, wobei die Streifen der Laufbeinsegmente L1 und L3 nur mit Verzögerung erscheinen. Eine solche Expression in alternierenden Streifen ist zwar auf das Prosoma der Milbe beschränkt, könnte aber auf einen Paar-Regel Mechanismus schließen lassen. Hierbei muss nicht unbedingt *Tu-pax3/7* selber die Paar-Regel Funktion übernehmen, es wäre auch möglich, dass dies über noch unidentifizierte Faktoren geschieht (Dearden et al. 2002). Die Expression eines zweiten Paar-Regel Gen Homologs der Milbe, die des *runt*

Gens, unterstützt die These von einem Paar-Regel Mechanismus allerdings nicht. *Tu-runt* wird in Ringen um die Beinknospen ausgeprägt und scheint keine Funktion bei der Körpersegmentierung zu haben (Dearden et al. 2002).

Auch weitere Daten aus Myriapoden und Crustaceen (Hughes und Kaufmann 2002b, zitiert in Davis und Patel 2003) liefern keine Hinweise auf einen Paar-Regel Mechanismus bei diesen Organismen. So wird zwar das *Lithobius atkinsoni even-skipped* Gen in einer posterioren Domäne ausgeprägt, die dann in ein streifenförmiges Muster übergeht, doch schließen die Autoren einen Paar-Regel Mechanismus aus (Hughes und Kaufmann 2002b).

Die Frage, ob ein Paar-Regel Mechanismus außerhalb der Insekten existiert, kann zurzeit nicht abschließend beantwortet werden. Betrachtet man nun vorliegenden Daten zu den Gap Genen, stellt man fest, dass zwar Sequenzen kurzer Fragmente von *Kr* und *hb* für verschiedene Arthropoden Spezies vorliegen (Sommer et al. 1992), jedoch bislang keine Expressionsdaten oder gar funktionelle Studien publiziert wurden. Es besteht also Bedarf, weitere Paar-Regel und Gap Gen Homologe außerhalb der Insekten zu analysieren.

## 1.2 Anneliden Segmentierung

Daten zur molekularen und morphologischen Entwicklung der Anneliden stammen meist aus Untersuchungen der Hirudinea oder der Polychaeta. Wie auch bei den Polychaeta werden bei den Hirudinea, den Blutegeln, Mesoderm und Ektoderm segmentiert. Dieses geschieht ausgehend von embryonalen Stammzellen, den Teloblasten (zur Übersicht: Weisblat et al. 1988, Irvine und Martindale 1996). Gibt es aber zwischen Anneliden und Arthropoden konservierte molekulare Segmentierungsprozesse? Dieser Frage sind in den vergangenen Jahren diverse Arbeitsgruppen nachgegangen (Iwasa et al. 2000, Seaver et al. 2001, Werbrock et al. 2001, Seaver und Shankland 2001, Song et al. 2002, Kang et al. 2003). Hierbei zeigte sich, dass bereits die Ebene der Segment-Polaritäts Gene nicht konserviert zu sein scheint. So erfüllen die Gene *engrailed* (*en*) und *hedghog* (*hh*) zwar Funktionen während der Entwicklung der Anneliden, doch sind sie wohl nicht an der Etablierung der anterior-posterior Achse beteiligt (Seaver et al 2001, Seaver und Shankland 2001, Kang et al. 2003). Auch einen Paar-Regel Mechanismus scheint es bei Blutegeln nicht zu geben. Die Analyse des *Helobdella even-skipped* Gens erbrachte zwar Hinweise auf eine

Funktion dieses Gens während der frühen Segmentierung, jedoch konnte ein doppelsegmentaler Mechanismus nicht nachgewiesen werden (Song et al. 2002).

Das Gap Gen *hunchback* (*hb*) wurde sowohl bei einem Polychaeten, als auch bei einem Bluteigel untersucht (Iwasa et al. 2000, Werbrock et al. 2001). Beide Studien ergaben, dass *hb* nicht am Segmentierungsprozess der Anneliden beteiligt ist, die neurale Funktion aber konserviert zu sein scheint.

### 1.3 Vertebraten Somitogenese

Die Somiten stellen die metameren Einheiten, sozusagen die Segmente der Vertebraten dar. Es sind, im Gegensatz zu den Segmenten der Arthropoden und Anneliden, transiente mesodermale Strukturen, aus denen unter anderem Vorläufer der Wirbel, Rippen und der skelettalen Muskulatur entstehen. Ausgehend von dem unsegmentierten *präsomitischen Mesoderm* (PSM) entsteht jeweils ein Paar Somiten (zur Übersicht: Pourquié 2001a, Saga und Takeda 2001).

Doch wie sehen die molekularen Mechanismen der Vertebraten Somitogenese aus, und gibt es Gemeinsamkeiten mit den Segmentierungsmechanismen der Arthropoden und Anneliden?

Die zentrale Rolle bei der Entstehung der Somiten spielt die Notch-Signalkaskade (zur Übersicht: Pourquié 1999, Saga und Takeda 2001). Diese hoch konservierte Signalkaskade dient der Zell-Zell Kommunikation und ist während der Entwicklung multizellulärer Organismen an diversen Prozessen beteiligt (zur Übersicht: Artavanis-Tsakonas et al. 1999, Baron et al. 2002). Mit der Bindung eines Liganden, im Fall der Vertebraten *Delta* oder *Jagged*, wird die intrazelluläre Domäne von *Notch* (NICD) abgespalten und kann im Kern mit dem Transkriptionsfaktor *Suppressor of Hairless* (*Su(H)*) interagieren. Eine solche Interaktion führt zur Aktivierung der Zielgene. Eine wichtige Rolle bei der Notch-Signalkaskade spielt das *Fringe* (*Fng*) Gen (Panin et al. 1997). *Fringe* ist eine Glykosyltransferase, die das Notch Protein modifiziert und dadurch die Interaktion mit den Liganden beeinflusst. Hierbei spricht man auch von einer Modulation des *Notch* Signals (Brückner et al. 2000, Moloney et al. 2000). Ein wichtiger Punkt hierbei ist, dass *Fng* nicht für die generelle Funktion von *Notch* notwendig ist. So spielt *Fng* z. B. keine Rolle wäh-

rend der Neurogenese von *Drosophila*, ist aber essentiell für die Etablierung von Grenzen, z. B. der dorso-ventralen Grenze in der Flügel Imaginalscheibe (Blair 1997, Panin et al. 1997, Irvine 1999).

Die Beteiligung der Notch-Signalkaskade an der Somitogenese wurde vor allem bei der Maus und beim Zebrafisch über funktionelle Studien nachgewiesen (Conlon et al. 1995, Oka et al. 1995, Hrabe de Angelis et al. 1997, Jen et al. 1997, Evrard et al. 1998, Zhang und Gridley 1998, del Barco Barrantes et al. 1999, Serth et al. 2003, Sieger et al. 2003). Hierbei wurden die Funktionen verschiedener *Notch*, *Delta*, *Fng* und *Su(H)* Vertebraten Homologe getestet.

Es stellte sich heraus, dass sich die Segmentierungsphenotypen dieser Gene ähneln. So bilden sich die Grenzen der Somiten irregulär, fehlen zum Teil und wirken deformiert. Auch die Somiten selber sind betroffen. Sie variieren in Größe, Form und Breite. Solche Effekte wurden auch bei dem klassischen Zebrafisch Mutagenese Screen gefunden (van Eeden et al. 1996). Auch hier waren die Somiten betroffen, wobei in einigen Fällen der Effekt erst mit der Formation von posterioren Somiten auftrat. Die Charakterisierung der Mutanten ergab, dass die Notch-Signalkaskade in diversen Fällen betroffen war (zur Übersicht: Saga und Takeda 2001).

Eine Funktion der Notch-Signalkaskade während der Somitogenese liegt also in der Formation der Somiten und der Etablierung derer Grenzen. Im Gegensatz dazu spielt *Notch* keine Rolle bei der Körpersegmentierung von *Drosophila* (Davis und Patel 1999).

1996 wurden von Müller et al. das Zebrafisch *her-1* Gen, ein angebliches Homolog des *Drosophila hairy* Gens, publiziert. Dieses löste eine Diskussion über einen möglichen gemeinsamen Ursprung der Arthropoden und Vertebraten Segmentierung aus (de Robertis 1997). Die Expression von *her-1* ließ zunächst auf einen doppelsegmentalen Paar-Regel Mechanismus schließen, jedoch zeigten bald weitere Studien am Zebrafisch und am Huhn, dass *her-1* bzw. *chicken-hairy* (*c-hairy*) zyklisch ausgeprägt werden und die Domänen innerhalb des PSMs segmental angelegt sind (Palmeirim et al. 1997, Holley et al. 2000).

Doch was macht solch eine, auch als oszillierend bezeichnete, Expression aus? Gene, wie *c-hairy* werden zunächst in einer Domäne im posterioren PSM ausgeprägt. Über mehrere Schritte wird diese Domäne auf einen schmalen Bereich im anterioren PSM reduziert, wo sich die Expression stabilisiert. Zu diesem Zeitpunkt beginnt der nächste Zyklus mit dem Erscheinen der beschriebenen posterioren Domäne.

Die Expression verläuft also in Wellen, was zur Folge hat, dass jede Zelle des PSMs zu einem bestimmten Zeitpunkt das Gen ausdrückt. Mit jeder dieser Wellen entsteht ein neues Paar Somiten (Palmeirim et al. 1997).

Eine oszillierende Expression konnte inzwischen auch für eine Reihe weiterer Gene, wie z. B. für verschiedene *Fng* Homologe aus Maus und Huhn sowie für *Delta* Homologe aus dem Zebrafisch nachgewiesen werden (zur Übersicht: Pourquié 2001b, Saga und Takeda 2001). Das *Notch* und *Delta* an der Somitogenese der Vertebraten beteiligt sind war bekannt, doch zeigte sich nun, dass die Notch-Signalkaskade ein wichtiger Bestandteil des molekularen Oszillators ist und für die Organisation der zyklischen Expression benötigt wird (Pourquié 1999, Holley et al. 2000, 2002; Jouve et al. 2000, Jiang et al. 2000, Oates und Ho 2002, Dale et al. 2003). So führen z. B. Mutationen von *DeltaD*, einem Zebrafisch *Delta* Homolog, zu Störungen des *her-1* Musters (Holley et al. 2000). Aber auch die Zebrafisch Gene *her-1* und *her-7* sind für die Etablierung einer oszillierenden Expression, z. B. der von *DeltaC*, notwendig. Funktionelle Analysen dieser Gene zeigten, dass sie zudem an der Formation der Somiten beteiligt sind (Oates und Ho 2002, Henry et al. 2002).

Die Notch-Signalkaskade hat somit neben der Funktion bei der Etablierung der Segmente auch eine wichtige Aufgabe in der Organisation der oszillierenden Genexpression.

Wie aber kann die Notch-Signalkaskade die Expression von Genen, wie *her-1* steuern? Um diese Frage beantworten zu können, muss zunächst geklärt werden, ob *her-1* oder *c-hairy* wirkliche *Drosophila hairy* Homologe sind.

Solche Gene, wie z. B. auch die *Drosophila Enhancer of split (E(spl))* Gene kodieren basische Helix-Loop-Helix (bHLH) Proteine, die zudem über eine so genannte *Orange* Domäne (bHLH-O) verfügen. Im Fall der Vertebraten ist eine eindeutige Unterscheidung, ob ein Gen nun den *Drosophila E(spl)* Genen oder *hairy* ähnlicher ist zumeist nicht möglich (zur Übersicht: Davis und Turner 2001, Iso et al. 2003). Aus diesem Grund werden die Zebrafisch Gene als *hairy/Enhancer of split related (her)* bezeichnet. Bei der Maus und der Ratte spricht man in der Regel von *hairy/Enhancer of split (Hes)* Genen. Allerdings ist die Nomenklatur noch komplexer. So existieren neben den *her* und *hes* Genen noch die *hey* Gene. Die HEY Proteine verfügen über einen gegenüber den HER/HES Proteinen veränderten C-Terminus (Iso et al. 2003).

Da bei *Drosophila* die *E(spl)* Gene über *Su(H)* und somit über *Notch* reguliert werden (Bailey und Posakony 1995), konnte aufgrund der Ähnlichkeit der Vertebraten *her/hes/hey*

Gene zu diesen *Drosophila* Genen angenommen werden, dass *Notch* hier ebenfalls via *Su(H)* wirkt. Diese Vermutung konnte inzwischen bestätigt werden (del Barco Barrantes et al. 1999, Sieger et al. 2003). Hierbei wurde deutlich, dass, wie auch bei *Drosophila*, *Su(H)* bestimmte regulatorische Elemente, die „*Suppressor of Hairless paired binding sites*“ (SPS), bindet und so diverse *her/hes/hey* Gene regulieren kann (Bailey und Posakony 1995, Gajewski und Voolstra 2002). Im Gegensatz dazu wird das *Drosophila hairy* Gen während der Körpersegmentierung nicht über *Notch* reguliert (Baonza und Freeman 2001, Davis und Turner 2001)

Die oszillierende Expression hängt also von der Notch-Signalkaskade und den *her/hes/hey* Genen ab. Hierbei scheint es zu einer periodischen Repression bestimmter Gene, sowie dem gezielten Abbau der entsprechenden Proteine zu kommen. Über einen solchen Mechanismus in Verbindung mit der Autoregulation verschiedener Gene, könnten die oszillierenden Expressionsmuster etabliert werden (Bessho et al. 2003, Dale et al. 2003, Hirata et al. 2003).

Allerdings müssen weitere Mechanismen an der Vertebraten Segmentierung beteiligt sein, da trotz des Ausfalls der Notch-Signalkaskade eine Segmentierung des PSMs stattfinden kann (Pourquié 1999, Saga und Takeda 2001). So spielt z. B. der *Fibroblasten Wachstums Faktor (FGF)* eine wichtige Rolle bei der Positionierung der segmentalen Grenzen und der Regulation der Hox Gene (Dubrulle et al. 2001).

Auch der Wnt-Signalweg ist an der Vertebraten Somitogenese beteiligt (Aulehla et al. 2003). Das *Wnt3a* Gen der Maus ist für die Organisation der oszillierenden Genexpression und auch für die Etablierung der Somiten essentiell. Es ist also durchaus möglich, dass über die Verbindung von Wnt und Notch-Signalkaskade die Segmentierung der Vertebraten reguliert wird (Aulehla et al. 2003).

## 1.4 Ziele der Arbeit

Inwieweit ist die aus *Drosophila* bekannte Segmentierungsgenkaskade für die Spinne *Cupiennius salei* konserviert? Gibt es einen doppelsegmentalen Paar-Regel Mechanismus und welche Rolle spielen die *Cupiennius* Gap Gene bei der Segmentierung?

Diese Fragen dienen als Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit und sollten anhand der Auswertung von Expressionsmustern und mittels funktioneller Studien beantwortet wer-



den. Das Ziel hierbei war, funktionell konservierte und divergente Aspekte der Arthropoden Segmentierung zu bestimmen und so einem „molekularen Archetyp“ für den Segmentierungsprozess der Arthropoden einen Schritt näher kommen zu können.

Aber auch die Analyse bisher aus *Drosophila* nicht bekannter Prozesse war ein Ziel dieser Arbeit. Hierbei stand die Frage im Vordergrund, ob die Notch-Signalkaskade, ähnlich wie bei Vertebraten, an der Segmentierung der Spinne beteiligt ist. Auch in diesem Fall sollten Analysen der Expressionsmuster und funktionelle Studien durchgeführt werden. Solch ein direkter Vergleich zwischen Arthropoden und Vertebraten könnte Hinweise auf die Evolution des Segmentierungsprozesses liefern, also helfen die Frage zu beantworten, ob es einen gemeinsamen Ursprung der Arthropoden, Anneliden und Vertebraten Segmentierung gibt.

## 2. Methoden

### 2.1 Molekulare Methoden

Soweit nicht anders vermerkt, wurden die in Sambrook et al. (1989) beschriebenen Standardmethoden und Lösungen verwendet. Bei der Nutzung von Kits wurde nach den Angaben der Hersteller verfahren.

#### 2.1.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur Generierung von PCR Fragmenten, die als Template für die Sonden- und Doppelstrang (ds)-RNA Synthese eingesetzt werden, wird eine so genannte A/E PCR durchgeführt. Hierbei werden Primer (pBS-A und pBS-E) verwendet, die den flankierenden Sequenzen der multiplen „Cloningsite“ komplementär sind. So kann das klonierte Fragment, mitsamt den Promotoren des Vektors, amplifiziert werden. Um genügend PCR Fragment zu erhalten, werden 100µl Ansätze verwendet.

Ansatz: 0,1µl DNA, 10µl 10x Puffer, 10µl dNTPs (2mM), 5µl pBS-A (20µM), 5µl pBS-E (20µM), 0,5µl (2,5U) *Ampli-Taq* Polymerase (Perkin Elmer), 69,4µl Wasser.

PCR Programm: 1 Minute 94°C; 30 Zyklen: 30 Sekunden 94°C, 45 Sekunden 60°C, 90 Sekunden 72°C; es folgen: 7 Minuten 72°C, Abbruch der Reaktion bei 4°C.

pBS-A: 5'-CTATGACCATGATTACGCCAAG-3'

pBS-E: 5'-TAACGCCAGGGTTTTCCCAAGT-3'

#### 2.1.2 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) PCR

Als Ausgangsbasis für die RACE PCR dient cDNA, an deren Enden Adaptoren „ligiert“ wurden. Jeder Adapter wird von einem speziellen Primer (AP-Primer, 10µM) gebunden. Die Verbindung mit einem genspezifischen Primer (GSP, 10µM) ermöglicht eine PCR, über die der Abschnitt zwischen GSP und AP-Primer amplifiziert wird. Diese erste Reaktion wird meist durch eine Nested PCR ergänzt, wobei hier die RACE Produkte als „Template“ dienen. Für die RACE und die Nested PCR wird der *Advantage 2 Polymerase*

*Mix* (Clontech) verwendet. Die PCR Ansätze und das Programm werden entsprechend den Angaben des Herstellers gestaltet. Die notwendige, mit Adaptoren versehene, cDNA wurde mir von Dr. Wim Damen zur Verfügung gestellt.

AP1: 5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3'

AP2: 5'-ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC-3'

GSP Fringe: 5'-GATGATGACAACCTATGTAAATGTGCCA-3'

Nested Fringe: 5'-CCTCAGAGGATTGGTACCTTGGC-3'

### 2.1.3 Erstellen einer *Cupiennius salei* genomischen Lambda Bibliothek

Zur Herstellung der genomischen Bibliothek wird das *Lambda DASH II /EcoRI Vector Kit* sowie das *Gigapack III Gold Packaging Extract Kit* (beide Statagene) verwendet. Zur Generierung der Inserts wird *Cupiennius salei* genomische DNA isoliert und jeweils 1 µg dieser DNA mit 0,0039U des Enzyms Sau3A (Roche) für 90 Minuten partiell geschnitten. Die geschnittene DNA wird mittels „Feld-Inversions-Gelelektrophorese“ nach Größe getrennt und die Fragmente im Bereich zwischen 18-22kb ausgeschnitten. Die Isolierung der DNA Fragmente erfolgt mittels des *QuiaEX Kits* (Qiagen).

### 2.1.4 Isolierung genomischer Klone

130.000 pfu (plaque forming units) wurden auf acht rechteckigen Petrischalen ausplattiert. Für die Plaquelifts wird Hybond-XL Nylonmenbran verwendet, wobei von jeder Platte zwei Abzüge gemacht werden. Nach dem primären „Screen“ wird der Bereich um ein positives Signal aus der Agarplatte ausgestochen und in Phagenpuffer inkubiert. Verschiedene Verdünnungen werden dann erneut ausplattiert, um positive Phagen zu vereinzeln. Bei Bedarf wird der „Rescreen“ wiederholt. Zur Herstellung der Sonde wird das gewünschte Fragment mittels PCR aus der bekannten cDNA amplifiziert und via dem *Megaprime-Kit* (Amersham) mit <sup>32</sup>P-dAPT radioaktiv markiert.

Die erhaltenen genomischen Fragmente werden über enzymatische Spaltungen kartiert. Hierzu wird neben der bereits verwendeten 5' auch eine 3'Sonde für Southern-Blot Analysen genutzt, um so den Anteil an upstream Sequenzen ermitteln zu können. Die 5'Sonde

umfasst den Bereich von Basenpaar 45 bis 585 der *hairy* cDNA, die 3'Sonde den Bereich von Basenpaar 940 bis 1385. Positive Klone werden mit geeigneten Enzymen geschnitten, Fragmente subkloniert und sequenziert.

### 2.1.5 Enzymatische Sequenzierung

Die Sequenzierung wird mittels eines *ABI Prism 377XL DNA Sequencers* (Applied Biosystems) durchgeführt. Es wird ein, gegenüber den Angaben des Herstellers, modifiziertes Protokoll verwendet.

Ansatz: 2µl *Big Dye Terminator Ready Reaction Mix*, 500ng der zu sequenzierenden DNA und 2µl Standard-Primer (M13 oder M13R, 2µM); xµl Wasser. Finales Volumen: 10µl. Die *Cycle Sequencing* Reaktion wird nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Ansätze werden über *Sephadex G50 Säulen* (Amersham Pharmacia) gereinigt und in einer Vakuumzentrifuge getrocknet.

M13: 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'

M13R: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

Sequenzvergleiche werden mit den Programmen *Sequence Navigator 1.0.1*, *Sequencing Analysis 3.0* (beide Applied Biosystems) und *DNASIS-Mac 2.0* (Hitachi) durchgeführt. Der Vergleich mit Genen, die bereits in Datenbanken (Genbank, NCBI) verfügbar sind, wird mit dem Programmen *BLASTn* und *BLASTx* (Altschul et al. 1990) durchgeführt.

### 2.1.6 Synthese von Doppelstrang (ds)- RNA

Die wichtigsten Änderungen gegenüber dem bestehenden Protokoll (Schoppmeier und Damen 2001) werden nachfolgend beschrieben. Die Synthese der Einzelstrang-(ss)-RNA findet nicht mehr getrennt in zwei Ansätzen, sondern in einer Reaktion statt. Zudem wird das Volumen des Ansatzes auf 30µl reduziert. Beide Maßnahmen erhöhen die Effizienz der Synthese. Alle verwendeten Enzyme und Puffer stammen von Roche.

Ansatz: 500ng A/E PCR Produkt (vgl. 2.1.1), 3µl 10x Transkriptions-Puffer, 3µl NTPs (10mM), 20U RNase Inhibitor, je 40U RNA-Polymerase (T7, T3 oder Sp6). Der Ansatz

wird mit Wasser auf 30  $\mu$ l aufgefüllt. Nach 2 Stunden auf 37°C wird die DNA durch Zugabe von 20U DNaseI entfernt (20 Minuten bei 37°C). Die DNaseI wird anschließend durch 1  $\mu$ l 0,5M EDTA und der folgenden Inkubation auf 65°C (10 Minuten) inaktiviert. Die RNA wird mittels einer Phenol/Chloroform Extraktion aufgereinigt und via Ethanol gefällt. Die gefällte RNA wird in 10  $\mu$ l Wasser aufgenommen und bei –80°C gelagert. Die Qualität der ds-RNA wird über ein Agarosegel kontrolliert. Hierbei wird neben der ds-RNA auch das zur Synthese eingesetzte PCR Produkt aufgetragen. Die ds-RNA sollte auf der Höhe des PCR Produktes laufen.

## **2.2 Embryologische Methoden**

### **2.2.1 Das Versuchstier**

Begattete *Cupiennius salei* Weibchen stammen aus der Zucht von Dr. Wim Damen in Köln. Die Spinnen werden einzeln in großen Einmachgläsern (2-3 Liter) gehalten, deren Boden mit handelsüblicher Torf-Blumenerde bedeckt ist. Die Gläser sind mit luftdurchlässigen Deckeln verschlossen und werden täglich mit Leitungswasser befeuchtet. Als Nahrung für die Spinnen dienen lebende Hausgrillen (*Acheta domestica*), die über eine Zoo-handlung bezogen werden.

### **2.2.2 Entnahme und Fixierung der Embryonen**

Die Embryonen befinden sich in einem Kokon, welchen die Spinne mit sich führt. Durch die Zugabe vom Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) wird die Spinne betäubt, der Kokon wird entfernt und die benötigte Anzahl an Embryonen entnommen. Nach dem Entfernen des Chorions durch waschen mit handelsüblicher Chlorbleiche, werden die Embryonen in einer 4%igen Formaldehydlösung in Heptan für mehrer Stunden fixiert. Die Heptanlösung wird durch Methanol ersetzt und die Embryonen bei -20°C gelagert. Das Entfernen der Vitellinmembran erfolgt per Hand mittels Dumont-Pinzetten (Nr. 5).

### 2.2.3 Injektionen von ds-RNA

Für die Injektionen werden 5µl der jeweiligen ds-RNA mit 0,5µl Phenolrot (Sigma P-0290) gemischt. Das Phenolrot dient als optischer Marker für die Injektion. Zur Kontrolle wird *green fluorescent protein* (GFP) ds-RNA injiziert. Der GFP Klon wurde mir von Dirk Sieger zur Verfügung gestellt. Zur Injektion wird ein *Eppendorf Mikro-Manipulator 5174*, der mit einer Mikro-Injektionseinheit (Femto-Jet, beide Eppendorf) verbunden ist, verwendet. Zudem kommt ein Binokular (Zeiss) zum Einsatz. Die Embryonen werden ventral in den Perivitellin-Bereich injiziert. Der Injektionsdruck und die Injektionsdauer werden der jeweiligen Injektionsnadel angepasst, so dass möglichst gleiche Volumina injiziert werden können. Der Winkel, unter dem die Injektionen vorgenommen werden, sollte zwischen 65° und 70° liegen. So können Schäden durch die Penetration der Nadel minimiert werden.

### 2.2.4 In-situ-Hybridisierungen und DAPI Färbungen

Für die in-situ-Hybridisierung vollständiger Embryonen („whole mount“) wurden bestehende Protokolle (Tautz und Pfeifle 1989) für die Spinne adaptiert (Damen und Tautz 1998). Hierbei müssen die beschriebenen Modifikationen für junge Stadien berücksichtigt werden (Damen und Tautz 1999). Auch für die DAPI (4',6'-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid, Roche) Färbungen sind vorhandene Protokolle übernommen worden (Damen und Tautz 1999). Die bei den in-situ-Hybridisierungen eingesetzten RNA-Sonden werden nach Klingler and Gergen (1993) hergestellt. Ein Protokoll für Doppelfärbungen steht zurzeit noch nicht zur Verfügung.

### 2.2.5 Antikörper Färbungen

Bereits fixierte Embryonen werden mehrfach mit PBST gewaschen und anschließend für 30 Minuten in PBST mit 10% BSA und 2% Ziegen Serum belassen. Der Kaninchen *anti-Phospho-Histon-3* Antikörper (Dianova, 111-065-003) wird in einer Verdünnung von 1:500 über Nacht eingesetzt. Anschließend werden die Embryonen erneut mehrfach mit PBST gewaschen, und mit dem Ziege *anti-Haase-Cy3* (Dianova) Antikörper in einer Verdünnung von 1:100 inkubiert. Nach 2 Stunden folgen weitere Waschstschritte.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Das *Cupiennius salei* pairberry-3 (pby-3) Gen

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, konnte die Frage ob bei der Spinne ein Paar-Regel Mechanismus existiert bislang nicht beantwortet werden. Aus diesem Grund sollte ein weiteres Paar-Regel Gen Homolog untersucht werden, dass des *Drosophila paired* (*prd*) Gens.

<b>a</b>		
Cs pby-3	QLGGVFINGRPLPNHIRLKIVELAAAGVRPCVISRKLRVSHGCVSKILNRYQETGSIRPG	
Cs pby-1	-----	
Cs Pby-2	-----	
Cs Pby-4	-----	
Dm prd	-----N-----M-DGI-----Q-----	
Dm Gsb	-----RQ---M-----Q-----FQ-----	
Dm Gsb-n	-----M-S-----Q-----	
Cs pby-3	VIGGSKPRVATPEVEKKIEEYKQDSPGIFSWEIRDRLI	aa 12-100
Cs pby-1	-----R-----	aa 1-98
Cs pby-2	-----,	aa 1-97
Cs pby-4	-----KSSVDS DTRSTD-CG-KEGSN-G--V--RVS	aa 1-98
Dm prd	-----I---I-NR-----RS---M-----EK--	aa 21-119
Dm gsb	-----DI-SR-----SQ-----AK--	aa 21-119
Dm gsbn	-----K-TS-I-TR-D-LRKEN-S-----EK--	aa 21-119
<b>b</b>		
Cs pby-3	QRRSRTTFSTEQLDMLEKAFERSQYPDIYTRE	aa 193-225
Cs pby-1	-----TAH---E-----T-----	aa 181-213
Cs pby-2	-----TAA---E-----	aa 181-213
Cs pby-4	-----A-----T-----	aa 181-213
Dm prd	---C---AS---E-----T-----	aa 193-225
Dm gsb	-----TA---A-----T-----	aa 192-224
Dm gsbn	-----ND-I-A-----T-----	aa 193-225

**Abbildung 1:** Sequenzvergleich verschiedener Pax III Gruppen Proteine. a) Sequenzen der *paired* Domäne. b) Teilsequenz der Homeodomäne. Bindestriche weisen auf identische Aminosäuren hin; Punkte auf Lücken in der Sequenz. Zugangsnummern: Dm *prd*: AAB59221, Dm *gsb*: P09082, Dm *gsbn*: NP\_523862. Dm: *Drosophila melanogaster*, Cs: *Cupiennius salei*, aa: Aminosäure.

Vier, von Dr. Wim Damen klonierte, PCR Fragmente wiesen eindeutige Ähnlichkeiten zu den *Drosophila* Pax III Gruppen Genen (PgIII) auf (Damen, nicht veröffentlicht). Neben

dem Paar-Regel Gen *paired* (*prd*) verfügt *Drosophila* über zwei weitere PglIII Gene, nämlich über das Segment-Polaritäts Gen *goosberry* (*gsb*) sowie über *goosberry-neuro* (*gsbn*), welches an der Neurogenese beteiligt ist (Noll 1993). Da die geringe Größe der *Cupiennius* Fragmente eine solche Unterscheidung anhand der Sequenz nicht zuließ (Abb. 1), wurden die Gene, in Anlehnung an die Nomenklatur von Davis et al. (2001), *pairberry1* bis 4 (*pby*) genannt. Die Nummerierung entspricht der Reihenfolge, in welcher die Gene kloniert wurden. Nur das *pby-3* Gen zeigte eine Expression in der Wachstumszone von Embryonen und wurde somit für weitere Untersuchungen gewählt. Die vollständigen Sequenzen sind im Anhang 1 aufgeführt.

### 3.1.1 Die dynamische und segmentale Expression von *pby-3*

Die Expression von *pby-3* findet in zwei Phasen, einem primären und einem sekundären Muster statt (Abb. 2 und 3). Das primäre Muster der Wachstumszone geht hierbei in das sekundäre, segmentale Muster über. Dieses sekundäre Muster erstreckt sich zunächst in einer streifenförmigen Expressionsdomäne über das gesamte Keimblatt (Abb. 2c und Abb. 3 a, d). Während der weiteren Entwicklung der Spinne spalten sich die beiden Hälften des Keimblattes und umwachsen den Dotter. Dieser Prozess wird als „Umrollung“ bezeichnet. Die *pby-3* Expression beschränkt sich nun auf den ventralen Bereich, bleibt aber in sämtlichen Segmenten des Spinnenkörpers bestehen. Eine Ausnahme bildet hierbei das erste opisthosomale Segment (O1), wo die Expression sich weiterhin nach dorsal erstreckt (Abb. 2e). Die segmentale Expression bleibt bis an das Ende des Segmentierungsprozesses stabil.

Das primäre Muster in der Wachstumszone ist recht komplex und lässt sich am besten an jüngeren Embryonen darstellen. Die Wachstumszone wird während der Entwicklung kleiner, was die Beobachtung von Expressionsmustern erschwert.

Die *pby-3* Expression in der Wachstumszone beginnt mit einer posterioren Domäne, die sich vom hinteren Bereich aus aufzulösen scheint (Abb. 3 a, b). Zunächst ist eine streifenförmige, die ursprünglich Form beibehaltende, Expressionsdomäne zu beobachten. Diese Domäne verlagert sich in Richtung anterior (Abb. 3 b, c). Zu diesem Zeitpunkt ist der hintere Bereich der Wachstumszone frei von Expression (Abb. 3c).



## Abbildung 2: Die segmentale *pby-3* Expression in älteren Stadien

Die Expression von *pby-3* in verschiedenen Stadien der Entwicklung. **(a-c)** Embryo mit sieben opisthosomalen Segmenten (O7). **(d-f)** Embryo mit zehn opisthosomalen Segmenten (O10).

**(a-c)** Embryo aus verschiedenen Blickwinkeln. *pby-3* wird segmental in den ventralen Bereichen des **(a, b)** Prosomas und **(c)** des Opisthosomas ausgeprägt. **(c)** Mit der Bildung von neuen Segmenten ist die *pby-3* Expression zunächst im gesamten Segment zu beobachten (Pfeil).

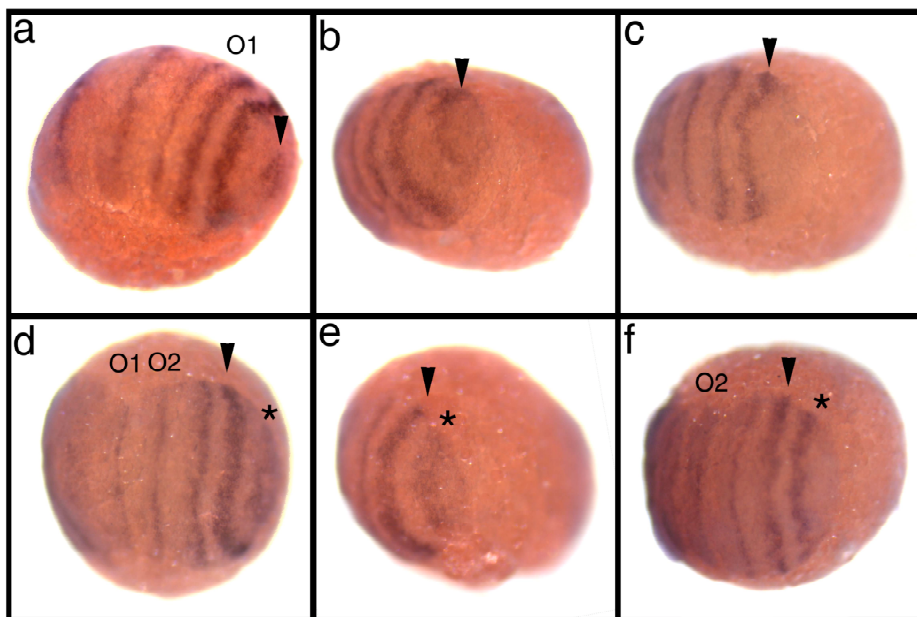
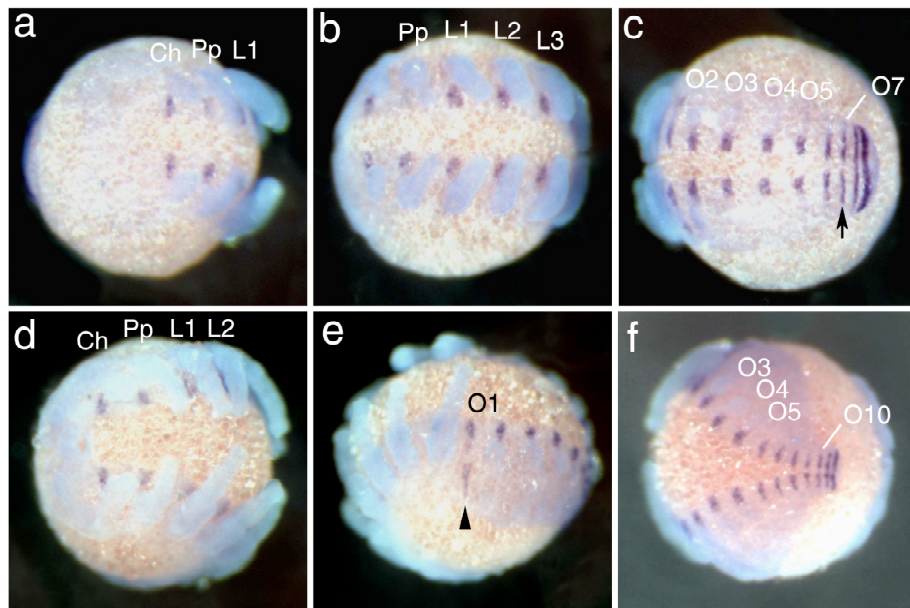
**(d-f)** das segmentale Muster in einem älteren Stadium der Entwicklung. Die Expression bleibt auf die ventralen Bereiche beschränkt, mit Ausnahme **(e)** des ersten opisthosomalen Segmentes (O1). Hier erstreckt sich die *pby-3* Expression auch in Richtung dorsal (Pfeilspitze). Bei allen Embryonen ist anterior links. **(e)** Seitenansicht. Ch: Cheliceren, Pp: Pedipalpen, L1-L4: Laufbeine, O: Segmente des Opisthosomas.

## Abbildung 3: Die dynamische *pby-3* Expression

Die Expression von *pby-3* in Embryonen mit **(a-c)** einem opisthosomalen Segment (O1) und **(d-f)** zwei opisthosomalen Segmenten (O2).

**(a)** eine Domäne (Pfeilspitze), die posterior in der Wachstumszone liegt, wird sichtbar. **(b)** die Domäne geht in eine streifenförmige Expression über und **(c)** gelangt in Richtung anterior. **(d)** erneut erscheint die posteriore Expression (Stern), die wiederum über mehrere Schritte **(e, f)** in eine anterior liegende Domäne übergeht.

Die Pfeilspitzen (a-f) markieren den ersten, die Sterne (d-f) den zweiten dynamischen Zyklus der *pby-3* Expression in der Wachstumszone. **(a, d)** zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung erstreckt sich die segmentale Expression noch über das gesamte Keimblatt (O1 bzw. O2). Anterior ist in allen Fällen links. O: Segmente des Opisthosomas.



Im nächsten Schritt erscheint erneut die beschriebene posteriore Domäne (Abb. 3d) und der Zyklus<sup>1</sup> beginnt erneut (Abb. 3 d-f). Diese hoch dynamische Expression ist bis an das Ende des Segmentierungsprozesses zu beobachten und entspricht den, für die Spinne beschriebenen Paar-Regel Gen Homolog Mustern von *hairy (h)*, *even-skipped (eve)* und *runt (run)* (Damen et al. 2000). Diese Gene werden ebenfalls dynamisch ausgeprägt, die zeitliche Abfolge der Expressionsstadien wurde aber nie genau bestimmt. Die bei diesen Studien verwendeten Embryonen wurden alle gleichzeitig fixiert, sollten also in vergleichbaren Stadien der Entwicklung sein. Allerdings entwickeln sich die Embryonen eines Kokons nicht vollständig synchron, sondern können Entwicklungsunterschiede aufweisen. Somit können auch sämtliche Stadien der dynamischen Expression bei gleichzeitig fixierten Embryonen auftreten. Um nun die genaue Abfolge der *phy-3* Expressionsstadien genau untersuchen zu können, wurden Embryonen eines Kokons im Abstand von einer Stunde fixiert (Zeitpunkt Null bis vier Stunden (0h-4h) bei 25°C) und für *phy-3* gefärbt. Für die Auswertung müssen zunächst die verschiedenen Stadien beschrieben werden. Wie in Abbildung 4a dargestellt, ist die *phy-3* Expression im Bereich der Wachstumszone in vier verschiedene Stadien (A bis D) schematisch eingeteilt worden. Diese Einteilung erfolgt anhand der Position und Form der Streifen. Im Stadium A ist die posteriore Expressionsdomäne noch nicht entstanden. Diese wird in B sichtbar und gelangt über die Stadien C und D in Richtung anterior. Mit dem Beginn eines neuen Zyklus werden die Stadien als A+ bis D+ gekennzeichnet. Werden nun auch die weiteren Expressionsdomänen der Wachstumszone mit einbezogen, ergibt sich das Bild aus Abbildung 4b. Hieraus wird deutlich, dass bis zu drei dieser Zyklen parallel ablaufen können. Ein Vergleich der schematischen Darstellung mit dem realen Expressionsmuster ist in Abbildung 6 dargestellt. Die Einteilung der Stadien (A bis D) wird durch die Auswertung der im Abstand von einer Stunde fixierten Embryonen bestätigt (vgl. Abb. 5). So wird deutlich, dass sich bei 1h die Mehrzahl der Embryonen im Stadium B befindet (43%). Im Verlauf der nächsten zwei Stunden nimmt dieser Wert stetig ab (31% bei 2h und 23% bei 3h). Im vergleichbarem Maße steigt die Zahl der Embryonen im Stadium C (26% bei 1h, 45% bei 2h und 43% bei 3h) und der Anteil der Embryonen im Stadium A reduziert sich (40% bei 0h, 24% bei 1h, 8,5% 2h und 2% bei 3h). Also folgt auf das Stadium A das Stadium B, welches dann von C abgelöst wird. Das bedeutet, dass die zunächst angenommene der realen Abfolge der Stadien entspricht.

---

<sup>1</sup> Der Begriff Zyklus steht hier in keinem Zusammenhang zu der „zyklischen Expression“ bestimmter Vertebraten Gene (vgl. Einleitung) und wird im Weiteren zu rein deskriptiven Zwecken genutzt.

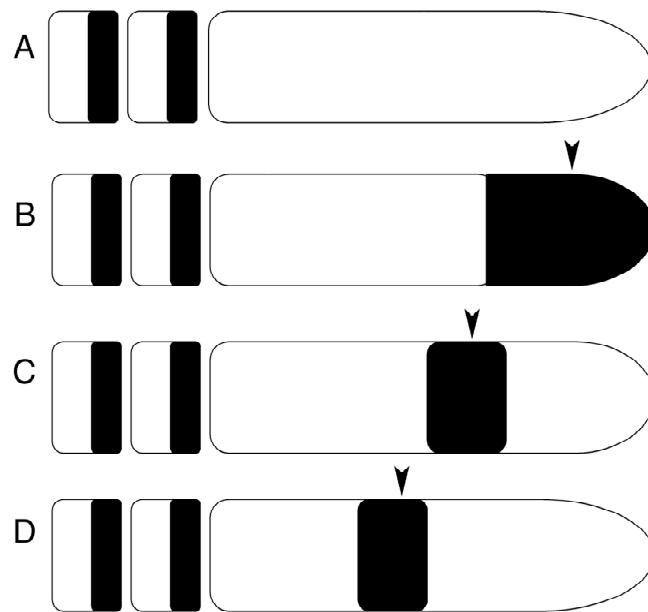
#### Abbildung 4: Schematische Darstellung der dynamischen *pairberry-3* Expression

**(a)** schematische Darstellung der Stadien der dynamischen *pby-3* Expression sowie **(b)** der parallel in der Wachstumszone laufenden dynamischen Expressionsdomänen. Gezeigt sind jeweils die Wachstumszone und zwei Segmente, wobei anterior links ist. Die *pby-3* Expression wurde in vier unterschiedliche Stadien (A bis D) eingeteilt. In den Segmenten wird *pby-3* posterior ausgeprägt.

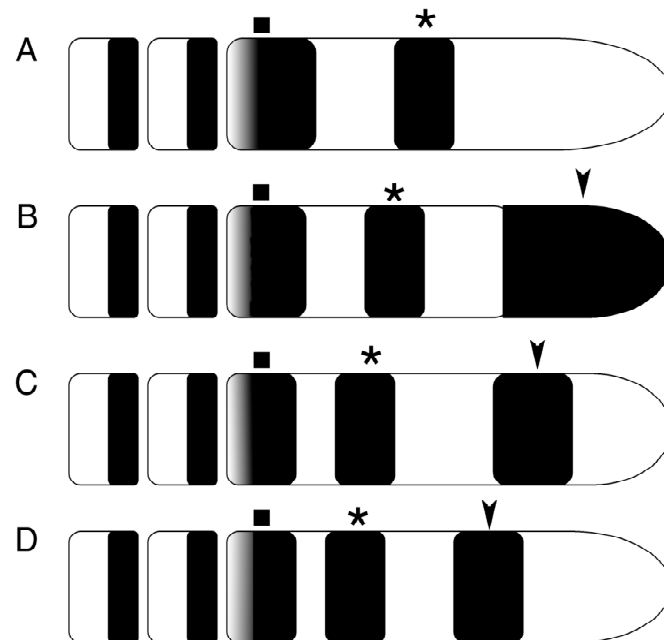
**(a)** im Stadium A ist die Wachstumszone frei von Expression. Die in Stadium B sichtbare Expressionsdomäne (Pfeilspitze) gelangt über mehrere Schritte (Stadien C und D) in Richtung des anterioren Endes der Wachstumszone. Es ist zu beachten, dass hier ein einzelner dynamischer Expressionszyklus dargestellt ist. In vivo sind immer mehrere parallel laufende Zyklen zu beobachten.

**(b)** in der Wachstumszone sind bis zu drei parallel laufende dynamische *pby-3* Expressionsdomänen, im Text als dynamische Zyklen bezeichnet, zu erkennen. Erneut erfolgt die Einteilung der Stadien von A nach D. Um die jeweils zusammengehörigen Domänen besser erkennen zu können, wurden verschiedene Markierungen verwendet. Pfeilspitzen markieren den ersten, Sterne den zweiten und Vierecke den dritten dynamischen Zyklus.

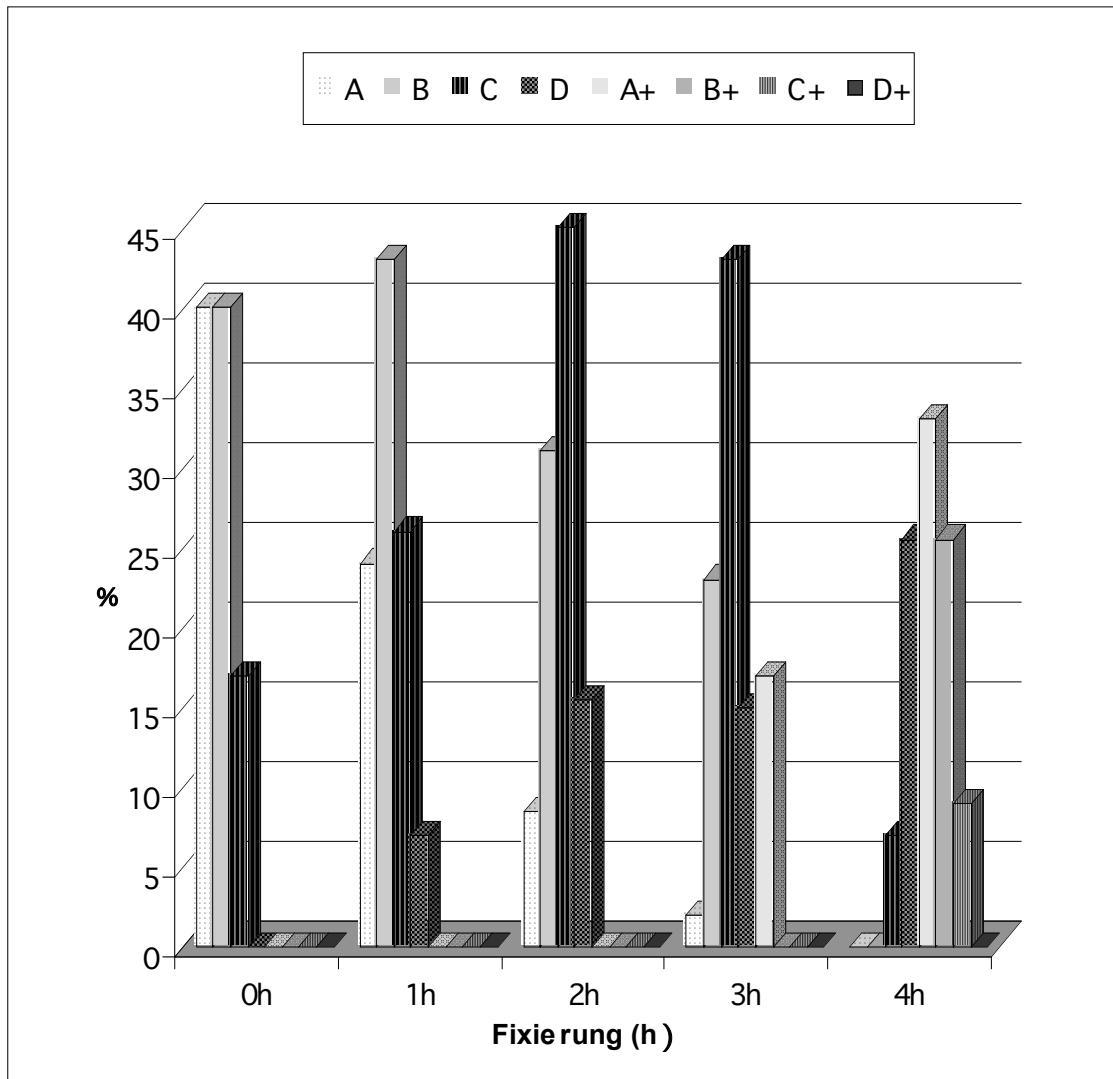
a



b



Die Frage nach der Dauer eines Zyklus lässt sich anhand der Daten nur sehr ungenau bestimmen. Wenn man den jeweiligen Maximalwert für die Zeiten von 0h bis 4h berücksichtigt, ergibt sich ein Wert von 3-4 Stunden pro Zyklus. Dieser Wert resultiert aus dem Zeitraum zwischen den Maximalwerten für A und A+. Um genauere Werte zu erhalten, müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden.



**Abbildung 5:** Statistische Auswertung der dynamischen *pby-3* Expression. Die Embryonen wurden im Abstand von einer Stunde fixiert (0h bis 4h), für *pby-3* gefärbt und die jeweiligen Stadien der dynamischen Expression bestimmt (A bis D+). Gezeigt ist der prozentuale Anteil von Embryonen in einem bestimmten Stadium zu den jeweiligen Zeitpunkten. 0h: n= 63; 1h: n= 58; 2h n= 71; 3h n= 64 4h n= 55. Die absoluten Zahlen sind im Anhang 2 aufgeführt.

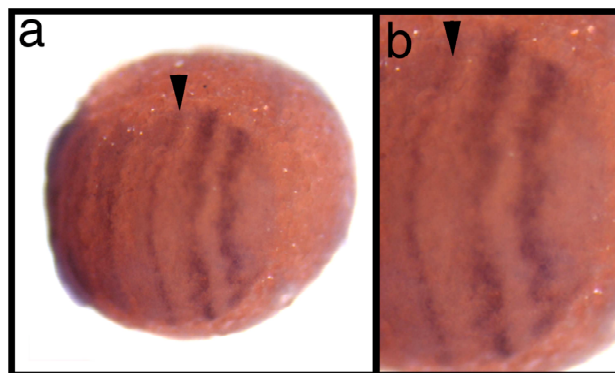
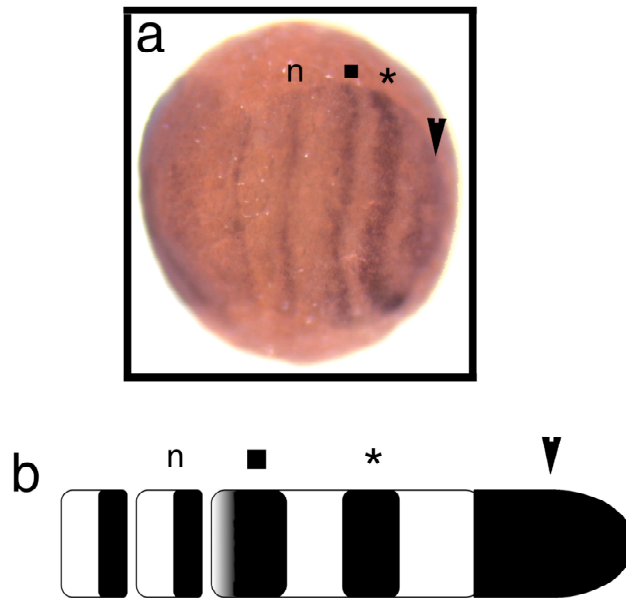
### Abbildung 6: Der Vergleich der *pby-3* Expression mit der schematischen Abbildung

(a) erkennbar sind drei parallel laufende *pby-3* Expressionsdomänen, im Text als dynamische Zyklen bezeichnet. Der erste dynamische Zyklus ist über eine Pfeilspitze, der zweite über einen Stern und der dritte Zyklus über ein Viereck gekennzeichnet. Mit „n“ wurde das zuletzt entstandene Segment (O2) markiert. Diese Expression würde einem B-Stadium entsprechen, da bereits die posteriore Domäne zu erkennen ist. (b) zum Vergleich die schematische Abbildung der dynamischen *pby-3* Zyklen. Die Kennzeichnung der einzelnen Streifen entspricht der in (a) dargestellten. Anterior ist links.

### Abbildung 7: Es ist keine Spaltung der *pby-3* Expressionsdomänen erkennbar

(a) dargestellt ist die dynamische *pby-3* Expression in der Wachstumszone sowie das sekundäre, segmentale Muster. (b) Vergrößerte Ansicht der Wachstumszone des Embryos aus (a). Der Pfeilkopf markiert in (a) und (b) die gleiche Expressionsdomäne. In diesem Bereich findet der Übergang zum segmentalen Muster statt.

(a) die Domäne (Pfeilkopf) erscheint segmental, mit einer stärkeren Expression im posterioren Bereich. (b) es kann keine Spaltung der Expressionsdomäne beobachtet werden, vielmehr wird die Expression auf einen schmalen Bereich reduziert (Pfeilkopf). Anterior ist links.





### 3.1.2 Segmente werden einzeln von der Wachstumszone abgespalten

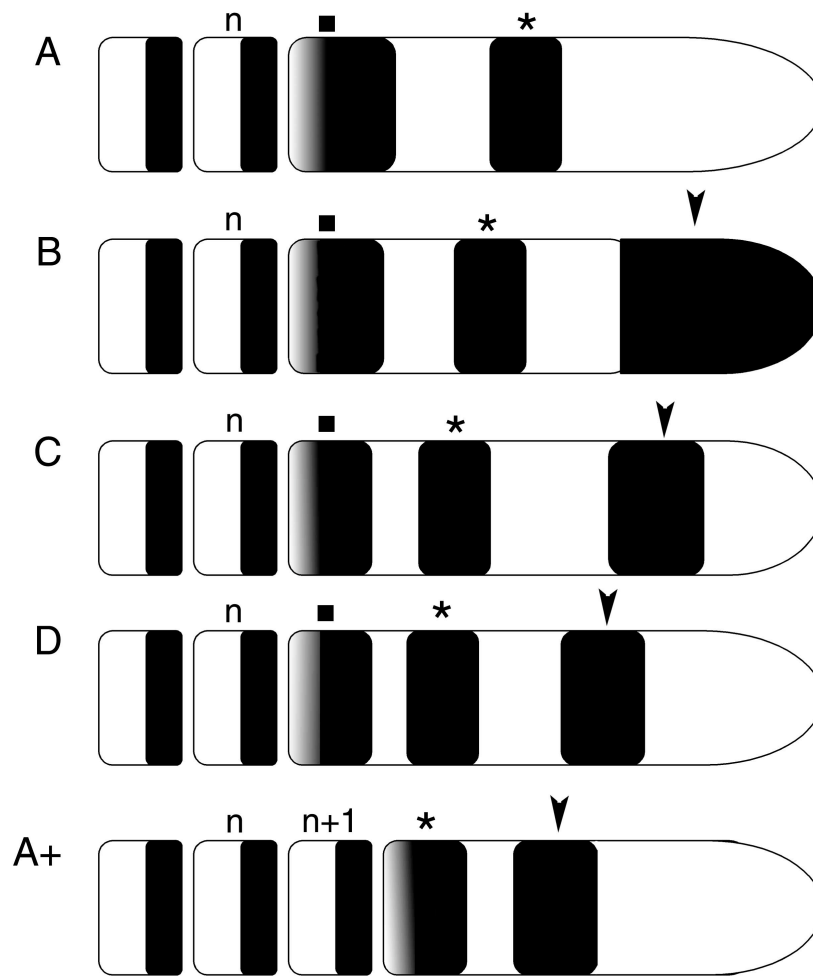
Es stellte sich nun die Frage, ob die Expression von *phy-3* in der Wachstumszone mit der Bildung von Segmenten korreliert werden kann. So könnte geklärt werden, ob es einen doppelsegmentalen Mechanismus während der Spinnenentwicklung gibt.

Wie beschrieben, wird das *phy-3* Gen in zwei Phasen ausgeprägt. Der Übergang vom primären, dynamischen Muster zum sekundären, segmentalen Muster geschieht in der Spinne, so wie auch in anderen Arthropoden, ohne erkennbare Zeitverzögerung. Im Fall von *Schistocerca* und *Tribolium* kann sogar die Spaltung der primären Streifen in das sekundäre Muster beobachtet werden, was auf einen doppelsegmentalen Mechanismus schließen lässt (Davis et al. 2001). Zudem erlaubt die segmentale Expression, die genaue Anzahl der Segmente zu bestimmen.

Wenn also bei der Spinne ein doppelsegmentaler Mechanismus vorliegt, könnte man die Aufspaltung von Expressionsdomänen in segmentale Muster erwarten, es sollten jeweils zwei neue Segmente entstehen. Eine solche Aufspaltung der primären Expressionsdomäne in zwei segmentale Streifen wurde aber in keinem Fall beobachtet, vielmehr kommt es zur Reduktion der letzten dynamischen Domäne bevor ein neues Segment entsteht (Abb. 7). Das legt die Vermutung nahe, dass die opisthosomalen Segmente der Spinne einzeln von der Wachstumszone abgespalten werden. Untersucht man nun die Anzahl der Segmente bei Embryonen in verschiedenen Stadien der Expression zeigt sich, dass beim Übergang von D nach A+ ein einzelnes Segment addiert wird. Alle in Abbildung 5 analysierten Embryonen der Stadien A bis D (für D, n=41) verfügen über die Laufbeinsegmente (L1 bis L4) und das erste opisthosomale Segment (O1). Mit dem Erreichen des Stadiums A+ war bei allen Embryonen (A+ oder älter, n=48) ein weiteres, das zweite opisthosomale Segment (O2) zu beobachten. Dieses zeigt nicht nur, dass die Segmente einzeln entstehen, sondern weist darauf hin, dass ein Segment pro dynamischem Zyklus entsteht (vgl. Abb. 8 und Abb. 3).

### 3.1.3 Zellteilungsmuster in der Wachstumszone sind nicht reproduzierbar

Was aber ist die Natur der dynamischen *phy-3* Expression? Im Prinzip sind mindestens zwei Szenarien denkbar. Zum einen könnten *phy-3* positive Zellen durch Zellproliferation oder Migration benachbarter Zellen in Richtung anterior „geschoben“ werden. Das

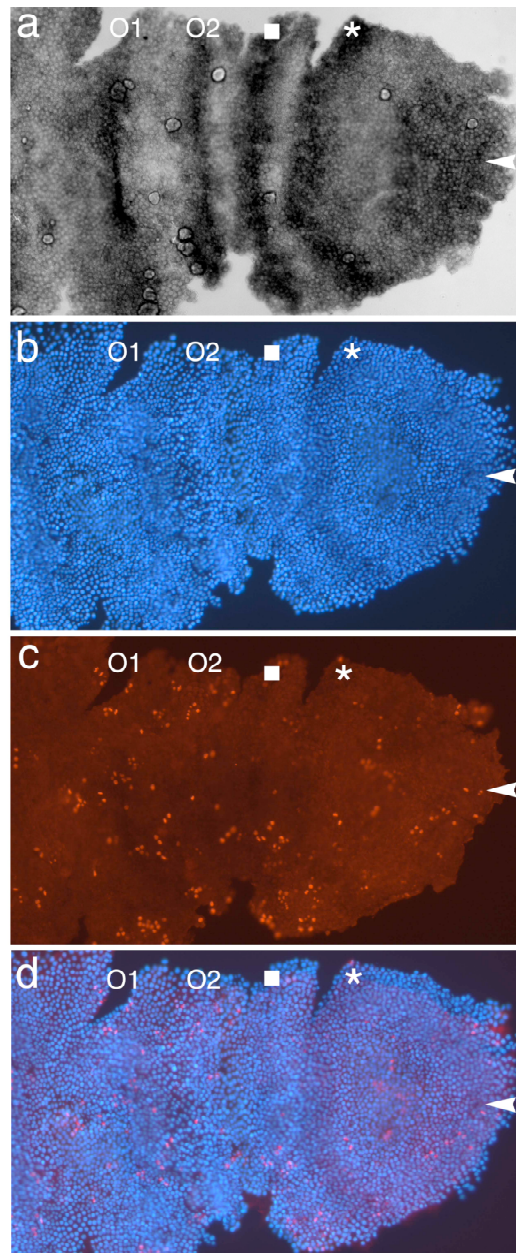


**Abbildung 8: Schematische Darstellung der vollständigen dynamischen *pby-3* Expression**

Dargestellt sind die dynamischen *pby-3* Expressionszyklen der Wuchszone, ausgehend von Stadium A bis hin zum Stadium A+. Gezeigt werden jeweils die Wuchszone und zwei Segmente (n), wobei anterior links ist. Es ist erkennbar, dass mit dem Übergang von D nach A+ ein Segment (n+1) entsteht. Zuvor kommt es zur Reduktion der anterioren Domäne (Viereck). Es wurden verschiedene Markierungen verwendet, um die jeweils zusammengehörigen Domänen besser erkennen zu können. Pfeilspitzen markieren den ersten, Sterne den zweiten und Vierecke den dritten dynamischen Zyklus.

### Abbildung 9: Die Zellteilungsmuster der Wachstumszone erscheinen ungeordnet

**(a-d)** Flachpräparat eines Embryos mit zwei opisthosomalen Segmenten. Gezeigt ist nur der Bereich posterior von O1. **(a)** *pyb-3* Expression in der Wachstumszone und den ersten opisthosomalen Segmenten. **(b)** zusätzliche DAPI Färbung. **(c)** anti-phospho Histon-3 Färbung. **(d)** Kombination der Färbungen. Die drei dynamischen Expressionsdomänen von *pyb-3* werden in (a-d) über eine Pfeilspitze, einen Stern und über ein Viereck gekennzeichnet. **(c)** die Zellteilungsmuster erscheinen ungeordnet und sind **(d)** nicht mit der *pyb-3* Expression korrelierbar. Anterior ist links. O: Segmente des Opisthosomas.



würde bedeuten, dass die einmal begonnene Expression in den Zellen durchgehend stabil bliebe. Jedoch besteht auch die Möglichkeit, dass verschiedene Zellen nacheinander *ppy-3* ausdrücken. Somit würde jede Zelle der Wachstumszone im Verlauf eines dynamischen Zyklus *ppy-3* positiv werden, die Streifen würden sich über die Wachstumszone „bewegen“.

Ein möglicher Ansatz diese Szenarien zu unterscheiden, ist die Analyse von Zellteilungsmustern in der Wachstumszone. Zu diesem Zweck wurde ein Anti-Phospho-Histon-3 Antikörper eingesetzt (Material und Methoden 2.2.5). Dieser erkennt phosphorylierte Histone, wie sie während der DNA Replikation auftreten und kann somit als Marker für Zellteilungen eingesetzt werden.

Um eine mögliche Verbindung zur *ppy-3* Expression herstellen zu können, wurde die Antikörperfärbung an bereits für *ppy-3* gefärbten Embryonen durchgeführt. Die zusätzliche DAPI Färbung sollte die Kerne sichtbar machen (Abb. 9). In keinem der untersuchten Embryonen (n=14) konnten reproduzierbare Zellteilungsmuster beobachtet werden. Vielmehr scheinen die Zellteilungen zufällig über den Bereich der Wachstumszone und der folgenden Segmente verteilt zu sein (Abb. 9c). Auch eine Korrelation mit der *ppy-3* Expression war nicht möglich; es konnte keine vermehrte Zellteilungsaktivität im Bereich der *ppy-3* Streifen festgestellt werden (Abb. 9a und d).

Dieser Versuch lässt vermuten, dass die Dynamik der *ppy-3* Expression nicht auf der Proliferation von Zellen basiert. Um den genauen Mechanismus bestimmen zu können, müssen weitere Analysen folgen, die jedoch bislang an technischen Schwierigkeiten gescheitert sind (vgl. Diskussion 4.1).

### 3.1.4 Paar-Regel Gen RNAi ergibt keine Segmentierungsdefekte

Funktionelle Untersuchungen der *Cupiennius salei* Paar-Regel Gen Homologe könnten Aufschluss über den Mechanismus der dynamischen Expression ergeben. In der Spinne kommt zu diesem Zweck die RNA Interferenz (RNAi) Methode zum Einsatz (Schoppmeier und Damen 2001). Trotz mehrfacher Versuche ist es allerdings nicht gelungen, reproduzierbare RNAi Phenotypen für *ppy-3* oder ein anderes Paar-Regel Gen Homolog der Spinne zu erhalten. Insgesamt wurden über 1000 Embryonen mit dsRNA komplementär zu

*pby-3*, *hairy*, *runt* oder *eve* injiziert. Hierbei kamen unterschiedliche Konzentrationen und Volumina der dsRNA zum Einsatz.

Da keine erkennbaren RNAi Phänotypen auftraten, könnte bedeuten, dass der RNAi Ansatz in diesen Fällen nicht funktioniert hat, oder, was doch eher unwahrscheinlich erscheint, die Gene üben keine erkennbare Funktion während der Segmentierung aus (vgl. Diskussion 4.1).

### **3.2 Die *Cupiennius salei* hairy cis-regulatorische Region**

Ein weiterer Ansatz, um die Frage nach einem möglichen Paar-Regel Mechanismus in der Spinne beantworten zu können, ist die Analyse der cis-regulatorischen Sequenzen dieser Gene. Hierzu sollte eine *Cupiennius salei* genomische Bibliothek erstellt werden, mit dem Ziel cis-regulatorische Sequenzen der Gene *hairy* oder *eve* zu klonieren. Des Weiteren sollten Reportergenkonstrukte erstellt und in *Drosophila* eingebracht werden. Über solch ein Konstrukt könnte geklärt werden, ob die *Cupiennius* regulatorischen Sequenzen in *Drosophila* noch aktiviert werden können, also vergleichbare Transkriptionsfaktoren die Expression von Paar-Regel Genen in der Spinne und *Drosophila* regulieren.

#### **3.2.1 Klonieren und Analyse von hairy regulatorischen Sequenzen**

Die primäre genomische Bibliothek enthielt etwa 40.000 voneinander unabhängige Klone, die, bei einer durchschnittlichen Größe von 20kb, einen Bereich von ca.  $8 \times 10^8$  bp abdecken. Nach der Amplifikation der primären Bibliothek betrug der Titer  $2 \times 10^7$  pfu/ml.

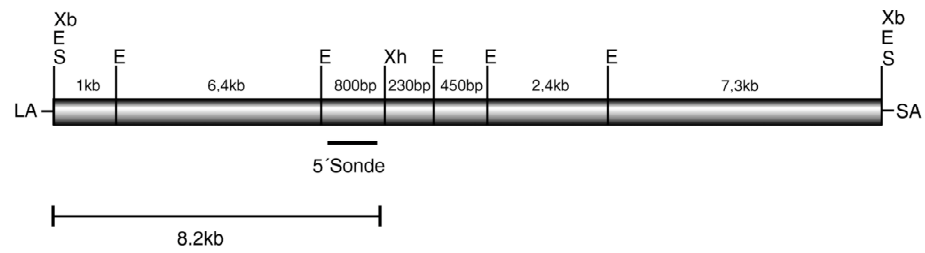
Der primäre Screen erbrachte neun potentielle Klone im Falle von *hairy* und fünf für *eve*. Weitere Analysen zeigten, dass keiner der *eve* Klone positiv war. Für *hairy* hingegen konnten insgesamt vier positive Klone, mit jeweils einer Insert-Größe von ca. 19kb, isoliert werden. Die Kartierungen zeigten jedoch, dass es sich jeweils um identische Klone handelte. Weitere Untersuchungen eines dieser Klone (Abb. 10a) ergaben, dass von den insgesamt 18,6kb des Inserts etwa 7,4kb „upstream“ des *hairy* Gens liegen.

### Abbildung 10: Schematische Darstellung des genomischen *hairy* Klons

Schematische Darstellungen des **(a)** vollständigen genomischen Klons und des **(b)** 8,2kb Fragmentes. **(c)** Sequenzvergleich verschiedener „*Suppressor of Hairless paired binding sides*“ (SPS).

**(a)** dargestellt ist der 18,6kb Lambda Klon; Angegeben sind die Schnittstellen verschiedener Enzyme sowie die resultierenden Fragmentgrößen. Der Bereich, an den die 5' Sonde bindet wurde ebenso markiert, wie das 8,2kb Fragment, welches für die weiteren Analysen verwendet wurde.

**(b)** neben 7,4kb der „upstream“ *hairy* Sequenz, wurden die ersten drei Exons sowie zwei Introns kloniert. Intronbereiche werden nach der gängigen Konvention dargestellt. Die Lage der Schnittstellen wurde über die Sequenzierung des Fragmentes bestätigt. **(c)** Vergleich von verschiedenen SPS Sequenzen. Die *Cupiennius* Sequenz umfasst 42bp im Bereich von bp 7198 bis 7240. Die *Su(H)* Bindungsstellen sind in „fetten“ Buchstaben dargestellt und die Hexamersequenzen unterstrichen. Punkte stellten Lücken in der Sequenz dar. Die Sequenzen für Dm, XI, Dr, und Fu stammen aus der Publikation von Gajewski und Voolstra (2002). Cs: *Cupiennius salei*, Dm: *Drosophila melanogaster*, XI: *Xenopus laevis*, Dr: *Danio rerio*, Fu: *Fugo rubripes*. LA: langer Arm; SA: kurzer Arm; E: EcoRI; S: Sall; Xb: XbaI; Xh: XhoI.

**a****b****c**

Cs hairy	TGTGCGAGCCTGAGAGCGTGTGTAGCCTCACACTTTCCCACG
Dm E(spl)m8	TGTGGAGAACTTACTTTCAGT.....GGGTTCCCACG
Xl hairy-2	CGTGGGAAAGAATGCA.GTAAGGT.....TTCACACG
Dr her1/7	GGTGAGAGAGTGTGTGCTAAAGTTTCAA.....ATTCCACC
Fr her 1/5	TGTGGGAACTTTGCCGCATGAGA.....ACTTTCACACA



Dieser Bereich wurde mitsamt der ersten drei Exons des *hairy* Gens subkloniert und sequenziert (Abb. 10b). Die Sequenzen sind im Anhang aufgeführt (Anhang 3).

Erst im Sommer 2003 konnte die Genomgröße von *Cupiennius salei* bestimmt werden (Gregory und Damen, nicht veröffentlicht). Sie beträgt für das haploide Genom  $2,17 \times 10^9$  bp. Damit deckt die genomische Bibliothek nur etwa 37% des Spinnengenoms ab, was auch die geringe Anzahl an positiven genomischen Klonen erklären würde.

Die Analyse der *hairy* „upstream“ Sequenz erbrachte eine potentielle Bindestelle für das *Su(H)* Protein (Abb. 10c). Wie bereits in der Einleitung erwähnt, binden diese Proteine sogenannte „*Suppressor of Hairless paired binding sites*“ (SPS), die aus zwei gegenüberliegenden *Su(H)* Bindestellen, sowie einer Hexamer Sequenz bestehen (Baily und Posakony 1995). Da diese SPS zwischen *Drosophila* und Vertebraten relativ gut konserviert sind (Gajewski und Voolstra 2002), konnte auch im Fall der Spinne eine potentielle SPS bestimmt werden.

Eine weitere Suche nach potentiellen Bindestellen für Transkriptionsfaktoren wurde nicht durchgeführt. Zwar stehen vor allem für *Drosophila melanogaster* inzwischen Programme zur Verfügung, die solche Bindestellen relativ genau voraussagen (Reibeiz et al. 2002), doch können bereits bei einem Sequenzvergleich zwischen nah verwandten Spezies Probleme auftreten, da regulatorische Sequenzen tendenziell schnell evolvieren (zur Übersicht: Tautz 2000). Auch aus diesem Grund wurden weitere Versuche eingestellt, geeignete Reporter-genkonstrukte für *hairy* zu generieren. Zuvor scheiterten bereits diverse Ansätze, ein solches Konstrukt herzustellen, an technischen Schwierigkeiten.

### 3.3 Die *Cupiennius salei* Krüppel-1 (*Kr-1*) und Krüppel-2 (*Kr-2*) Gene

Die Gap-Gene sind die ersten zygotisch ausgeprägten Gene der *Drosophila* Segmentierungskaskade. Auf dieser Ebene gibt es außerhalb der Insekten nur sehr wenige Informationen. Aus diesem Grund sollte die Rolle der *Cupiennius salei* Krüppel Homologe (*Kr-1* und *Kr-2*) während der Spinnensegmentierung untersucht werden.

Ausgehend von einem bereits vorhandenen Fragment (Sommer et al. 1992) wurden von Dr. Wim Damen zwei Krüppel (*Kr-1* und *Kr-2*) Homologe isoliert und mir für die weitere Analyse zur Verfügung gestellt.

Die *Kr-1* Sequenz umfasst 1947bp mit einem offenen Leserahmen (ORF) von Nukleotid 313 bis 1719 und einem 468 Aminosäuren großen Protein. Die 1055bp von *Kr-2* enthalten einen ORF von Nukleotid 406 bis 1055 und ergeben ein Protein von 215 Aminosäuren. Das der ORF bis an das Ende der Sequenz reicht zeigt, dass noch weitere 3' liegende Sequenzen fehlen. Beide Proteine enthalten fünf C2H2 Zink-Finger Domänen (vgl. Abb. 11), wie diese auch bei *Drosophila* vorkommen (Rosenberg et al. 1986). Die vollständigen Sequenzen der *Cupiennius salei* Krüppel Gene sind im Anhang 4 und 5 aufgeführt.

	<b>ZF1</b>	<b>ZF2</b>	<b>ZF3</b>	
Cs-1	LFV <b>C</b> N <b>I</b> CHRSFGYK <b>H</b> VLQ <b>N</b> HER <b>T</b> HTG <b>E</b> KPF <b>E</b> CK <b>E</b> CH <b>R</b> FT <b>R</b> DH <b>L</b> K <b>T</b> HM <b>R</b> L <b>H</b> TG <b>E</b> KPY <b>H</b> <b>C</b> SH <b>C</b> ER <b>Q</b> F <b>V</b> Q <b>V</b> AN <b>L</b> RR <b>H</b> LR <b>V</b> <b>H</b>			
Cs-2	A-T-S--N-Q-----P-----Q-P--D-H-----			
Dm	S-T-K--S-----P--D-----D-----			
Ag	V-T-K--S-----P-----S-T--D-----			
BCL6	PYK-DR-QA--R--GN-AS-KTV-----YR-NI-GAQ-N-PAN----T-I-S-----K-ET-GAR-----H--A-VLI-			
	<b>ZF4</b>	<b>ZF5</b>		
Cs-1	TGERPY <b>S</b> CT <b>L</b> CPS <b>R</b> FS <b>D</b> SN <b>Q</b> LKA <b>H</b> LL <b>I</b> HEG <b>K</b> KPY <b>E</b> CP <b>K</b> CNG <b>H</b> FRR <b>R</b> H <b>L</b> V <b>H</b> H <b>K</b> CPRDEAN	(aa 106-245)		
Cs-2	-----A-----E-----D---R-E--FQ-TE-C-R---R--I-----K--S-	(aa 67-206)		
Dm	-----T-EI-DGK-----S-M-V-T-E--F--ER-HMK-----MN---GIQSPP	(aa 221-360)		
Ag	---K--E-EM-DQK-----M-S-S-Q--FH-DR--SSY-----L---GLPSPP	(aa 229-368)		
BCL6	---K--P-EI-GT--RHLQT--S--R--T-E---H-E--L---HKSQ-RL-LRQKHGAI	(aa 545-684)		

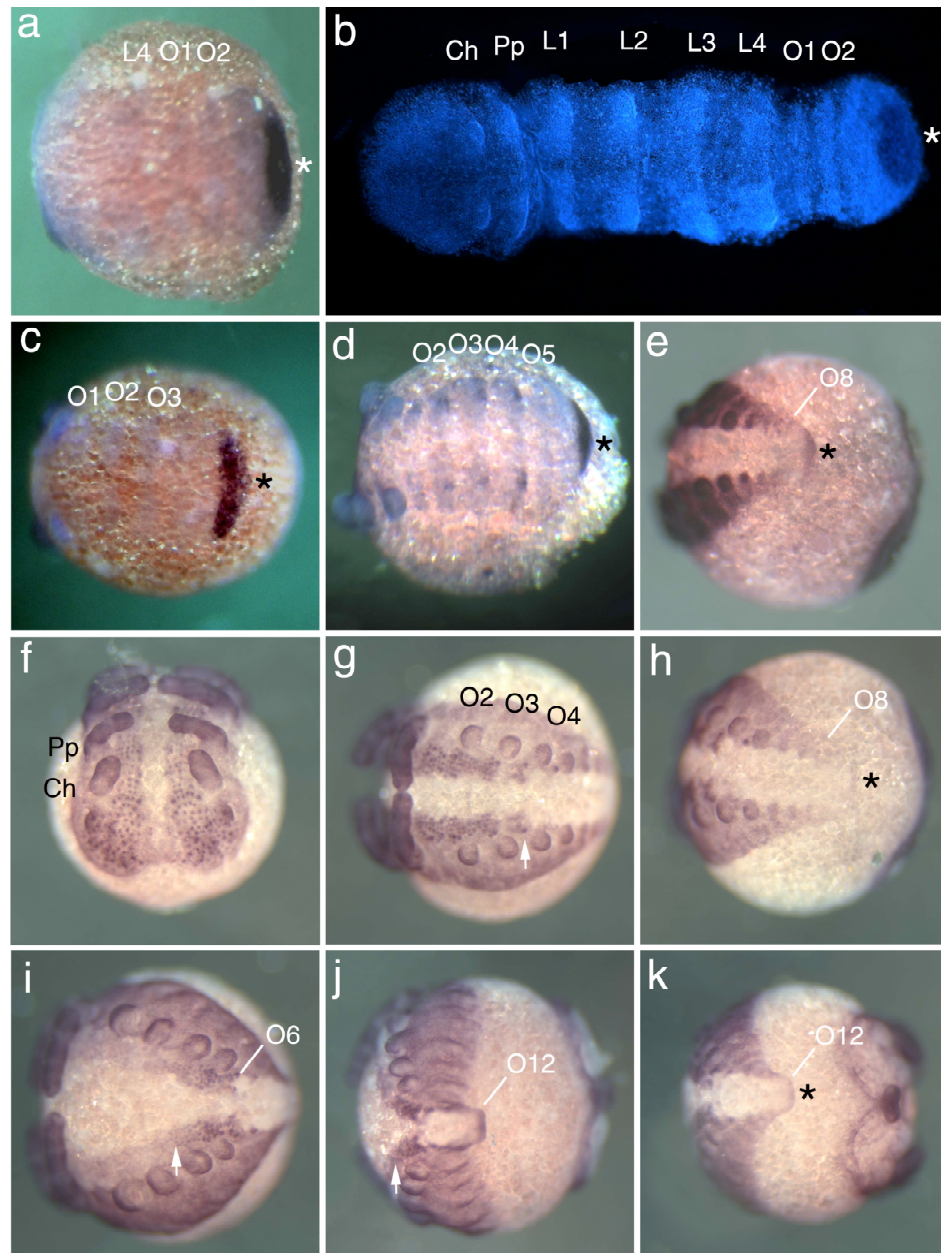
**Abbildung 11:** Sequenzvergleich der fünf C2H2 Zink-Finger verschiedener Krüppel Proteine. Bindestriche weisen auf identische Aminosäuren (aa) hin; Cystein (C) und Histidin (H) der Zink-Finger sind in „fett“ dargestellt. Zugangsnummern der Sequenzen: Dm-Kr: CAA27148, Ag-Kr: EAA00396, BCL6: Homo sapiens B-cell lymphoma 6 protein A48752. Cs: *Cupiennius salei*, Dm: *Drosophila melanogaster*, Ag: *Anopheles gambiae*, aa: Aminosäure.

### 3.3.1 Die *Kr-1* Expression in der Wachstumszone und im Neuroektoderm

Die früheste erkennbare Expression von *Kr-1* ist auf die Wachstumszone beschränkt. Dort kann zunächst eine große, posterior liegende Domäne beobachtet werden (Abb. 12 a, b). In diesem Stadium der Entwicklung wurden bereits die opistosomalen Segmente O1 und O2 angelegt. Im Verlauf der weiteren Entwicklung reduziert sich die Domäne immer weiter und ist schließlich auf einen schmalen Bereich im posterioren Ende der Wachstumszone beschränkt, bleibt aber bis an das Ende des Segmentierungsprozesses erhalten (Abb. 12 c-e und k). Mit der Bildung neuer Segmente wird zwar auch die Wachstumszone kleiner, jedoch nicht in dem Maße wie die Expression reduziert wird. Dieses ist vor allem beim Übergang vom zweiten zum dritten opistosomalen Segment.

### Abbildung 12: Die *Krüppel-1* Expression in verschiedenen Stadien der Entwicklung

(a) die früheste erkennbare Expressionsdomäne liegt posterior in der Wachstumszone von Embryonen mit zwei opisthosomalen Segmenten (O2). (b) Flachpräparat eines Embryos im gleichen Stadium wie (a), zusätzliche DAPI Färbung. (c-e) die posteriore Domäne reduziert sich im Verlauf der Entwicklung, bleibt aber erhalten. Die Sterne (\*) in a-e markieren das jeweilige posteriore Ende der Wachstumszone. (e) Die aufkommende neurale Expression von *Kr-1* ist stärker als die Ausprägung in der Wachstumszone. (f-h) Neurale *Kr-1* Expression. Der gleiche Embryo aus verschiedenen Perspektiven. (f) Kopflappen, (g) Segmente des Opisthosomas und (h) Wachstumszone. Pfeile weisen auf das letzte Segment mit *Kr-1* Expression im Neuroektoderm (g), bzw. den Beginn der neuralen Färbung in älteren Stadien (i-j) hin. (i-j) die neurale Expression ist in älteren Stadien auf die Segmente O5 und O6 beschränkt, alle Segmente wurden bereits gebildet. (k) die Färbung im posterioren Bereich bleibt erhalten (Stern). Anterior ist, mit Ausnahme von (f) links. (f) Aufsicht auf den Kopfbereich. Ch: Cheliceren, Pp: Pedipalpen, L1-L4: Laufbeine, O: Segmente des Opisthosomas.



(O2 nach O3) gut erkennbar. Die Form der Domäne ändert sich und sie wird zudem noch wesentlich schmaler (Abb. 12 a-c). Die *Kr-I* Expression in diesem Bereich ist auch schwächer als die aufkommende „punktförmige“, neuroektodermale Färbung. Diese beginnt, mit der Formation des achten opisthosomalen Segmentes (O8) im Bereich des Kopfes und reicht zunächst bis O4 (Abb. 12 f-h). Später kann die *Kr-I* Expression auch in weiteren Segmenten des Opisthosomas beobachtet werden, sie bleibt aber auf die Segmente bis O6 beschränkt (Abb. 12 i-j). Zu diesem Zeitpunkt ist bereits keine neurale Färbung der anterioren Segmente mehr erkennbar.

Für die Analyse der Expressionsmuster stehen nicht alle frühen Stadien der Spinnenentwicklung zur Verfügung. Dieses hängt mit Problemen bei der Fixierung junger Embryonen zusammen. Die Stadien, in denen sich der Kopf und die Segmente der Laufbeine (L1-L4) entwickeln, sind quasi nicht zugänglich. Somit kann auch für das *Kr-I* Gen eine wesentlich frühere Expression als die beschriebene nicht ausgeschlossen werden.

### 3.3.2 *Kr-I* RNAi führt zum Abbruch des Segmentierungsprozesses

Die Expression von *Kr-I* in einer breiten Domäne innerhalb der Wachstumszone ließ vermuten, dass *Kr-I* an der Segmentierung der Spinne beteiligt ist. Aus diesem Grund sollten funktionelle Untersuchungen mittels RNAi erfolgen.

Zwei Tage alte Embryonen wurden mit *Kr-I* dsRNA injiziert und für vier Tage auf 28°C belassen. Um mögliche, durch die Injektion verursachte, unspezifische Phänotypen erkennen zu können, wurde GFP dsRNA injiziert. Auch uninjizierte Embryonen dienten der Kontrolle. Zur Analyse potentieller RNAi Phänotypen wurden *engrailed* Färbungen durchgeführt. *engrailed* dient hier als segmentaler Marker (Damen 2002a). Eine zusätzliche DAPI Färbung hilft die Morphologie der Embryonen darzustellen.

Die *Kr-I* RNAi Embryonen entwickeln sich zunächst normal. Die Segmente des Prosomas, die Extremitäten und die ersten vier Segmente des Opisthosomas weisen keine morphologischen Veränderungen auf (Abb. 13 g, h und k, l). Allerdings werden nach der Formation von O4 bzw. O5 keine weiteren Segmente mehr gebildet (Abb. 13 h, i und l, m). Die Segmentierung stoppt und auch im Verlauf der weiteren Entwicklung kommt es nicht zu einer Wiederaufnahme des Segmentierungsprozesses. Die DAPI Färbungen zeigen deutlich, dass die Segmente ab O4/O5 fehlen und auch die Wachstumszone betroffen ist. Hier scheinen

kaum mehr Zellen vorhanden, die Wachstumszone ist stark ausgedünnt und Strukturen fehlen vollständig (Abb. 13m). Insgesamt 49% der mit *Kr-1* dsRNA injizierten Embryonen weisen solche starken Defekte auf (Tabelle 1). Schwächerer Phenotypen (vgl. Ergebnisse 3.3.3) werden in dieser Statistik gesondert aufgeführt.

	Total (n)	Segmentierungs Phenotyp	schwächerer Segmentierungs Phenotyp	Keine Effekte	Unspezifische Effekte
<b>Keine Injektion</b>	76	0 (0%)	0 (0%)	69 (91%)	7 (9%)
<b>GFP dsRNA</b>	119	0 (0%)	0 (0%)	105 (88%)	14 (12%)
<b>Kr-1 dsRNA</b>	408	200 (49%)	52 (13%)	133 (33%)	23 (5%)

**Tabelle 1:** *Krüppel-1* RNAi verursacht Segmentierungsdefekte. Gezeigt sind die absoluten Zahlen (n), sowie der prozentuale Anteil an Embryonen mit einem Abbruch der Segmentierung bei O4/O5 nach der Injektion von *Kr-1* dsRNA. Im Fall der „schwächeren“ Segmentierungsphenotypen werden nach O4/O5 noch weitere Segmente angelegt. Kontrollembryonen wurden entweder nicht injiziert („keine Injektion“) oder mit dsRNA, korrespondierend zu GFP. Zudem ist der Anteil unspezifischer Effekte aufgeführt. O: Opisthosoma.

Die Anzahl der Segmente wird auch über die *engrailed* Färbung bestimmt. Diese erscheint aber auch in nicht betroffenen Segmenten des Opisthosomas gestört (Abb. 13h und 14 c, d). Normalerweise wird *engrailed* in ventralen Bereichen des Keimblattes in Blöcken ausgeprägt, die anterior im Parasegment liegen (Abb. 14 a, b; Damen 2002a). Im Fall der *Kr-1* RNAi Embryonen erscheint die Expression nicht mehr durchgehend, sondern eher punktförmig, teilweise aufgelöst (Abb. 14 c, d). Der Grund hierfür liegt wohl in der neuronalen Funktion von *engrailed*, die auch in *Drosophila* von *Krüppel* reguliert wird (Romani et al. 1996). Somit scheint dieser Effekt nicht in direktem Zusammenhang mit den Segmentierungsdefekten zu stehen.

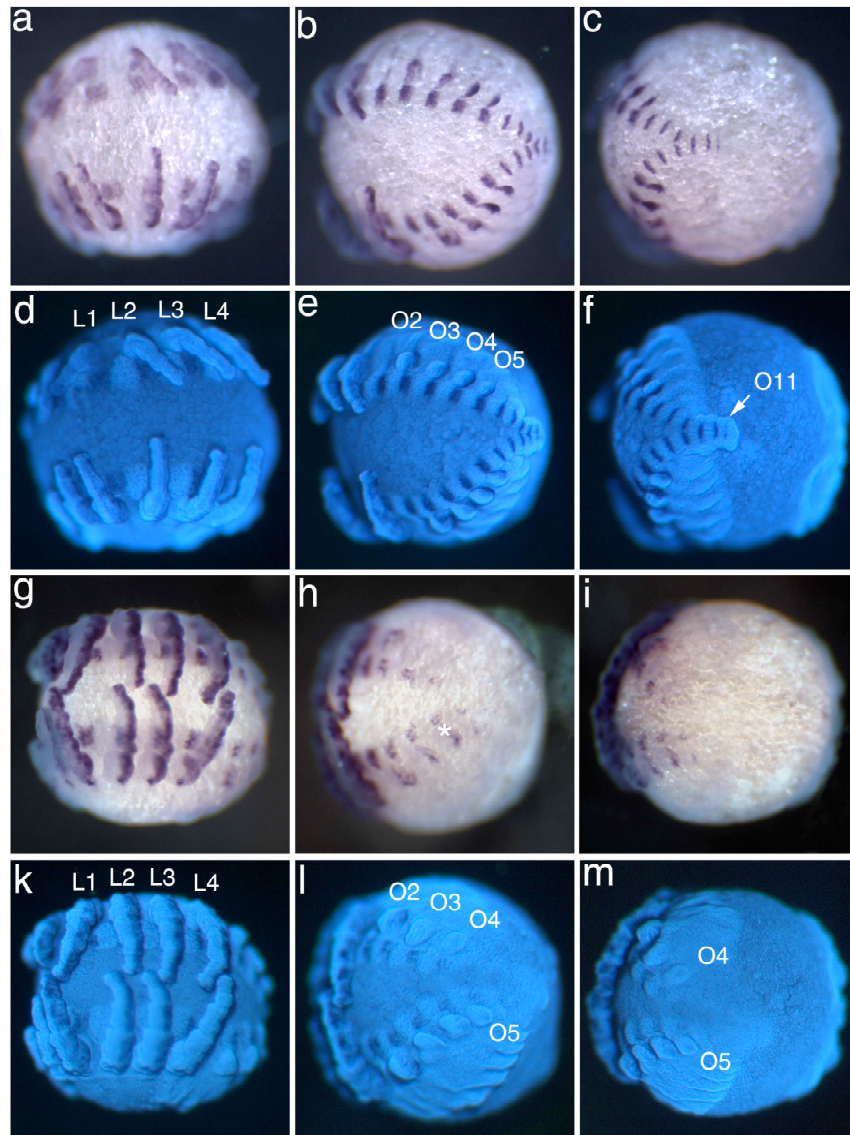
Es stellte sich nun die Frage, wie die Segmentierungsdefekte zustande kommen. Hierzu wurden mit *Kr-1* dsRNA injizierte Embryonen mit der Bildung des vierten opisthosomalen Segmentes fixiert, um so den Zeitpunkt analysieren zu können, bei dem das Eintreten des RNAi Effektes zu erwarten war. Es zeigte sich, dass sich die Wachstumszonen scheinbar vom posterioren Ende her aufzulösen scheint (Abb. 15), die bis dahin formierten

### Abbildung 13: *Krüppel-1* RNAi führt zum Abbruch des Segmentierungsprozesses

(a-f) Kontrollembryo mit GFP dsRNA injiziert und (g-m) *Kr-1* RNAi Embryo, jeweils aus verschiedenen Blickwinkeln. Die Embryonen wurden für *engrailed* und zusätzlich für DAPI (d-f und k-m) gefärbt.

Dargestellt sind (a, d) die Laufbeinsegmente, (b, e) die Segmente des Opisthosomas und (c, f) die Wachstumszone der Kontrolle. Es sind elf *engrailed* Streifen im Opisthosoma erkennbar. (g, k) das Prosoma und die Extremitäten der *Kr-1* RNAi Embryonen entwickeln sich normal. (h, l) nach der Bildung von O4/O5 stoppt die Segmentierung, es werden keine weiteren Segmente gebildet. Der Stern (\*) in (h) weist auf eine anormale *engrailed* Expression in O4 hin. (i, m) die Wachstumszonen der RNAi Embryonen sind kaum noch erkennbar und wirken wie aufgelöst. Anterior ist in allen Fällen links.

L1-L4: Laufbeine, O: Segmente des Opisthosomas.





#### Abbildung 14: Die Expression von *engrailed* ist in *Kr-1* RNAi Embryonen gestört

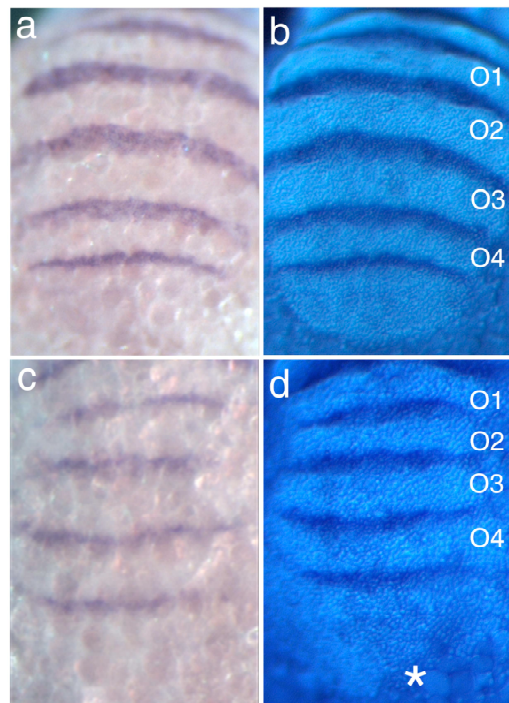
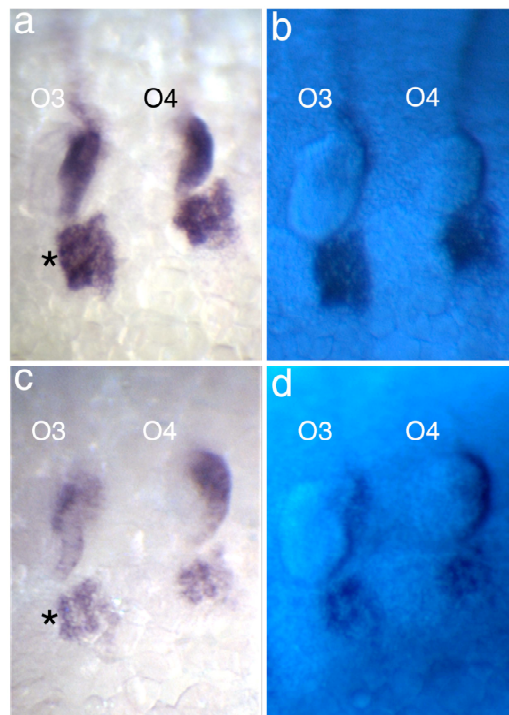
Vergrößerte Darstellung der Segmente O3 und O4 von **(a, b)** Kontroll- und **(c, d)** *Kr-1* RNAi Embryonen. (a, c) *engrailed*, (b, d) zusätzliche DAPI Färbung.

**(a, b)** ein Block von Zellen, die *engrailed* ausprägen liegt im anterioren Bereich des Parasegmentes (Stern). **(c, d)** im Falle der *Kr-1* RNAi Embryonen erscheint die *engrailed* Domäne aufgelöst, mehr punktförmig (Stern), obwohl sich die Segmente O3 und O4 hier normal gebildet haben. Anterior ist Oben. O: Segmente des Opisthosomas.

#### Abbildung 15: Die Wachstumszonen von *Kr-1* RNAi Embryonen lösen sich von posterior her auf

Vergrößerte Darstellung der Segmente O1 bis O4 von **(a, b)** Kontroll- und **(c, d)** *Kr-1* RNAi Embryonen. (a, c) *engrailed* und (b, d) zusätzliche DAPI Färbung.

**(a, b)** die Segmente des Opisthosomas sowie die Wachstumszonen der mit GFP dsRNA injizierten Kontrollembryonen erscheinen normal. **(c, d)** auch bei den *Kr-1* RNAi Embryonen sind keine Veränderungen der Segmente O1-O4 zu erkennen. **(d)** die Wachstumszone ist nicht mehr regulär geformt und scheint sich von posterior her aufzulösen (Stern). Anterior ist Oben. O: Segmente des Opisthosomas.



Segmente entwickelten sich normal. Somit könnten die sich auflösenden Wachstumszonen der Grund für die Segmentierungsdefekte sein. Es sind nicht mehr genügend Zellen vorhanden, um nach O4/O5 weitere Segmente zu formieren. Der Effekt erscheint allerdings nicht symmetrisch in der Wachstumszone, sondern verschiedene Bereiche sind unterschiedlich stark betroffen (Abb. 15d). Dieses könnte auch eine Erklärung dafür sein, dass bei den meisten *Kr-I* RNAi Embryonen der Effekt auf den beiden Seiten des Keimblattes unterschiedlich stark ist. Häufig wird auf einer Seite noch O4 gebildet, während auf der anderen Seite die Segmentierung erst nach der Formation von O5 stoppt. In solchen Fällen stehen auf einer Seite des Keimblattes mehr Zellen für die Bildung von Segmenten zur Verfügung als auf der Anderen.

### **3.3.3 Die dynamische *hairy* Expression in schwächeren *Kr-I* RNAi Phenotypen ist nicht verändert**

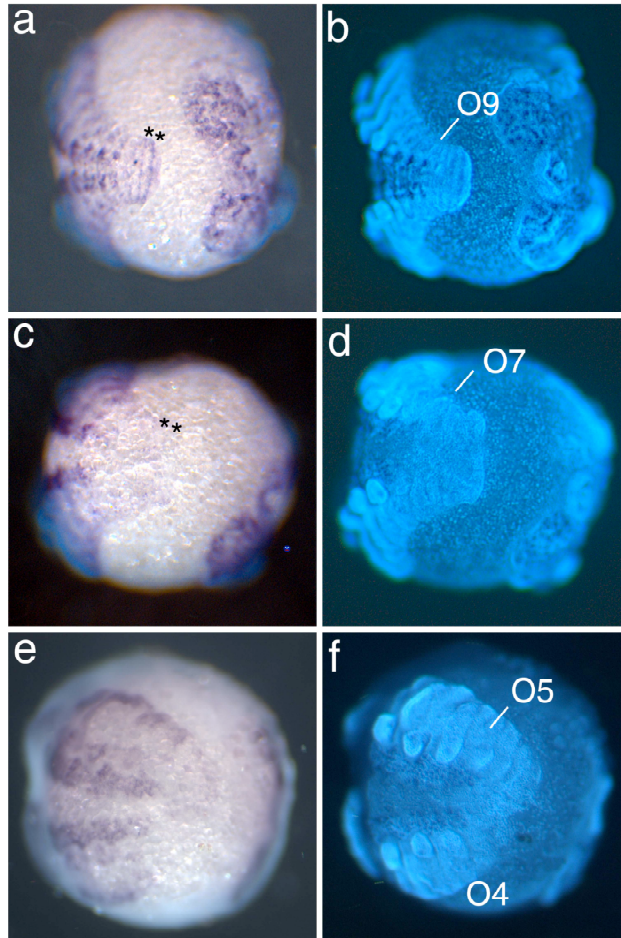
Bei *Drosophila* wirkt das *Krüppel* Gen primär als Repressor für andere Gap und Paar-Regel Gene (Ingham 1988). Falls nun die Injektion von *Kr-I* dsRNA die Expression des *Cupien-nius salei* Paar-Regel Gen Homologs *hairy* beeinflussen würde, könnten daraus eventuell Rückschlüsse auf regulatorische Interaktionen und somit auf mögliche Funktionen des *Kr-I* Gens gezogen werden. Zu diesem Zweck wurden an *Kr-I* RNAi Embryonen *hairy* Färbungen durchgeführt.

Im Fall der starken *Kr-I* RNAi Phenotypen macht die Auflösung der Wachstumszone eine Auswertung von Expressionsdaten unmöglich. In solchen Embryonen konnte keine *hairy* Färbung im Bereich der Wachstumszone beobachtet werden (Abb. 16 e, f). Um dieses Problem zu umgehen, wurden Embryonen mit schwächeren RNAi Phenotypen verwendet. Im Falle von schwachen *Kr-I* RNAi Phenotypen verläuft die Segmentierung zwar ebenfalls nicht normal, doch tritt der RNAi Effekt eher graduell auf. Das bedeutet, dass mehr Segmente entstehen können und auch die Deformationen der Wachstumszone milder ausfallen. Bei solchen Embryonen konnte eine schwächere, aber vollständige dynamische *hairy* Expression nachgewiesen werden (Abb. 16 c, d). Die *hairy* Streifen können also normal gebildet werden, obwohl die *Kr-I* Funktion zumindest reduziert wurde.

**Abbildung 16: Die *hairy* Expression bei Embryonen mit schwächeren *Kr-1* RNAi Phänotypen ist nicht verändert**

**(a, b)** GFP dsRNA injizierter Kontrollembryo. **(c, d)** schwächerer *Kr-1* RNAi Phänotyp. **(e, f)** starker *Kr-1* RNAi Phänotyp. Dargestellt sind die opisthosomale Segmente sowie die Wachstumszonen. Die Embryonen wurden für *hairy* und zusätzlich für DAPI (b, d, f) gefärbt.

**(a, b)** GFP injizierten Kontrollen entwickeln sich normal, die dynamische *hairy* Färbung in der Wachstumszone ist vorhanden (Sterne). **(c, d)** schwächerer *Kr-1* RNAi Phänotyp. Es bilden sich sieben opisthosomale Segmente (O7). Die **(d)** Wachstumszone ist noch erkennbar, das **(c)** dynamische Muster ist vorhanden, aber schwächer (Sterne). **(e, f)** stärkerer RNAi Phänotyp zum Vergleich. **(f)** die Segmentierung stoppt nach der Bildung von O4/O5, die Wachstumszone wirkt wie aufgelöst. **(e)** es ist keine spezifische *hairy* Expression in der Wachstumszone erkennbar. Anterior ist in allen Fällen links. O: Segmente des Opisthosomas.



### 3.3.4 Die *Kr-2* Expression im Keimblatt und im Neuroektoderm

Die Expression von *Kr-2* erstreckt sich vom posterioren Teil des dritten Laufbeinsegmentes (L3) bis hin zum jeweilig letzten gebildeten Segment. Sie umfasst den gesamten Bereich dieser Segmente, die Wachstumszone ist allerdings frei von Expression. So weisen Embryonen mit vier opisthosomalen Segmenten eine Färbung beginnend bei L3 bis hin zu O4 auf (Abb. 17 a-c). Bereiche, die anterior von L3 liegen sind vollständig ungefärbt. Das Gleiche gilt, wie beschrieben, für die Wachstumszone.

Im weiteren Verlauf der Entwicklung verändert sich jedoch dieses Bild. Mit der Formation des sechsten opisthosomalen Segmentes (O6), löst sich die flächig wirkende Expressionsdomäne auf und erscheint nun mehr „punktförmig“. Diese Expression von *Kr-2* ist weiterhin auf den Bereich zwischen L3 und O6 beschränkt, obwohl nun auch eine Färbung der Beine erkennbar wird (Abb. 17 d, e). Die „punktförmige“, neuroektodermale Expression dehnt sich weiter aus, umfasst bald den gesamten Embryo und bleibt bis an das Ende der Embryonalentwicklung stabil (Abb. 17 f, g). Allerdings kann auch hier, wie im Fall von *Kr-1*, eine Expression in Stadien der Entwicklung, die nicht zugänglich sind, nicht ausgeschlossen werden (vgl. Diskussion 4.2).

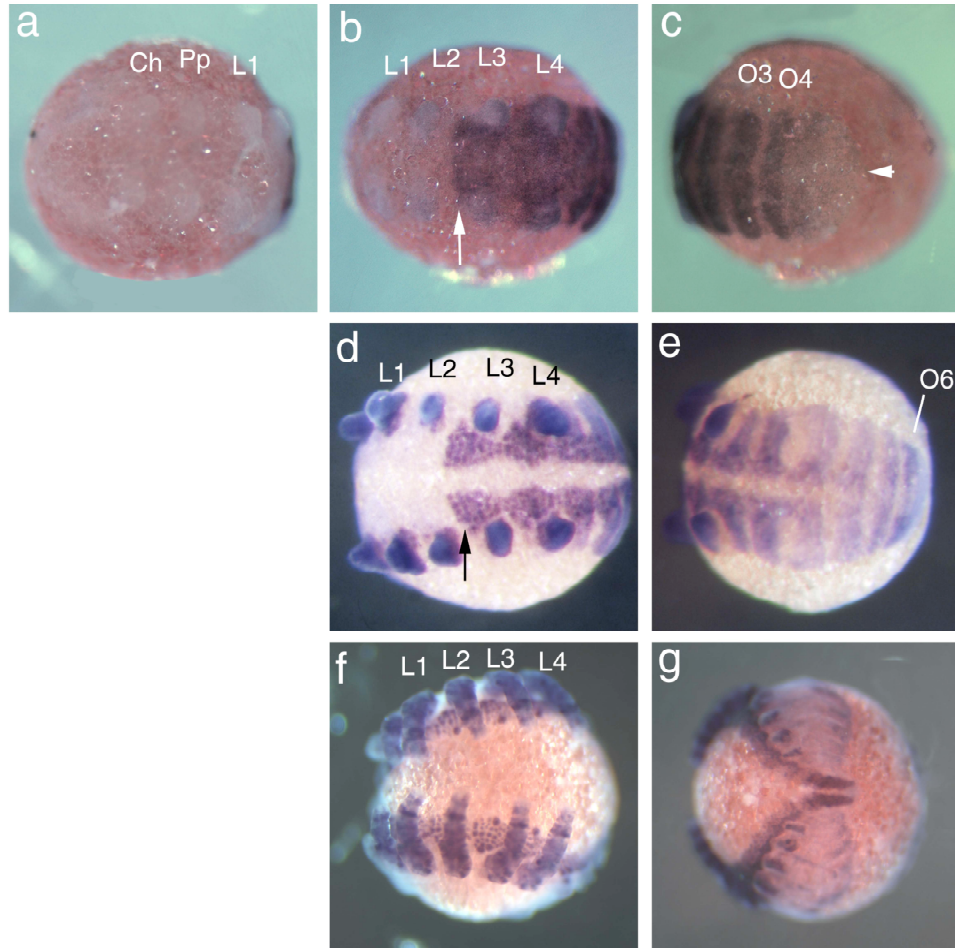
### 3.3.5 *Kr-2* RNAi resultiert nicht in Segmentierungsphänotypen

Auch hier sollten funktionelle Untersuchungen helfen, Aussagen über eine mögliche Beteiligung von *Kr-2* an der Spinnensegmentierung treffen zu können.

Wie auch im Fall von *Kr-1* (vgl. Ergebnisse 3.3.2) wurden *engrailed* und DAPI Färbungen zur Analyse potentieller RNAi Phänotypen eingesetzt. Allerdings konnten auch nach mehrfachen Versuchen keine spezifischen Defekte beobachtet werden (nicht gezeigt). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die *Kr-2* RNA nicht in genügendem Maße reduziert werden konnte. Aus diesem Grund wurden an *Kr-2* dsRNA injizierten Embryonen eine *Kr-2* Färbung durchgeführt (Abb. 18). Diese ergab, dass zwar die Expression im Bereich des Kopfes oder auch des ventralen Neuroektoderms reduziert werden konnte, die *Kr-2* Expression aber nicht vollständig ausgeschaltet wurde. Vielmehr waren bestimmte Bereiche, wie die Beine scheinbar gar nicht betroffen. Die dortige Expression erscheint annähernd normal (Abb. 18 b, e).

### Abbildung 17: Die Expression von *Kr-2* in verschiedenen Stadien der Entwicklung

**(a-c)** Expression von *Kr-2* in einem Embryo mit vier opisthosomalen Segmenten (O4) aus verschiedenen Perspektiven. **(a)** der Kopflappen und die Segmente der Ch, Pp sowie L1 und L2 weisen keine Färbung auf. **(b)** die Färbung, beginnend bei L3 (Pfeil), erstreckt sich bis O4 (c). **(c)** die Wachstumszone ist frei von Färbung (Pfeilspitze). **(d, e)** die Expression von *Kr-2* geht in ein „punktförmiges“, neurales Muster über. **(d)** prosomale Segmente. Die Domäne, beginnend bei L3, bleibt zunächst erhalten (Pfeil). **(e)** Färbung der sechs opisthosomalen Segmente (O6). **(f, g)** die neurale *Kr-2* Expression erstreckt sich über den ganzen Embryo. Anterior ist in allen Fällen links. Ch: Cheliceren, Pp: Pedipalpen, L1-L4: Laufbeine, O: Segmente des Opisthosomas

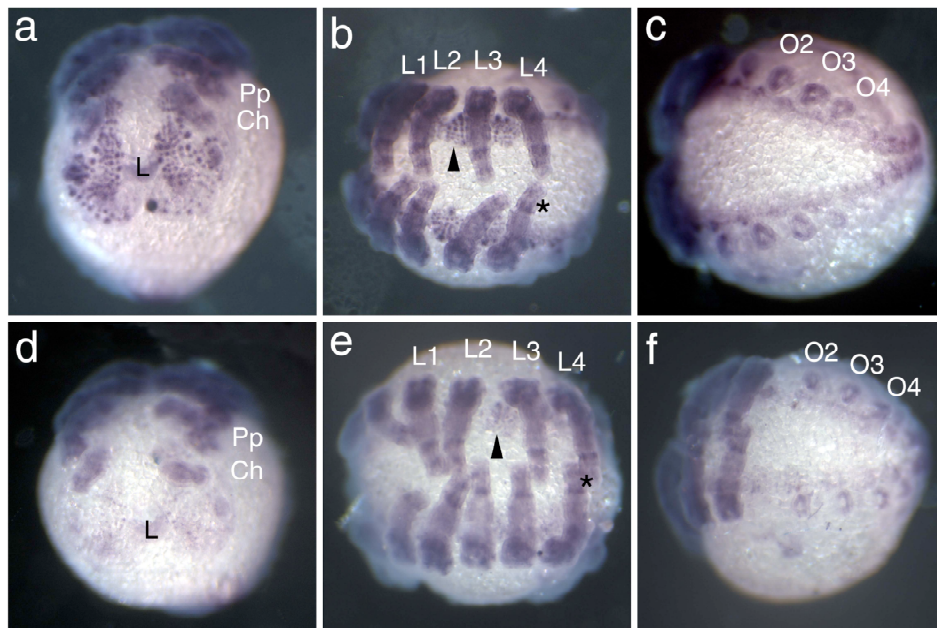




### Abbildung 18: *Kr-2* RNAi resultiert in der Reduktion der *Kr-2* Expression

**(a-c)** GFP dsRNA injizierter Kontrollembryo. **(d-f)** *Kr-2* RNAi Embryo. Alle Embryonen wurde für *Kr-2* gefärbt.

**(a-c)** das neurale *Kr-2* Muster im **(a)** Kopfbereich, **(b)** dem Prosoma und **(c)** dem Opisthosoma. **(d-f)** die Expression von *Kr-2* wirkt gegenüber der Kontrolle reduziert. Es ist eine schwächere Expression im **(d)** Kopfbereich und im **(e)** ventralen Neuroektoderm erkennbar (Pfeilspitze in b und e). Allerdings ist das Muster in den Beinen (Stern in b und e) und im **(f)** Opisthosoma weniger beeinträchtigt. Anterior ist, mit Ausnahme von a und d, links. (a, d) Aufsicht auf den Kopfbereich. L: Labrum Ch: Cheliceren, Pp: Pedipalpen, L1-L4: Laufbeine, O: Segmente des Opisthosomas.



Es scheint also nicht gelungen, das Niveau der *Kr-2* Expression hinreichend zu reduzieren. Ob *Kr-2* nun eine Funktion während des Segmentierungsprozesses der Spinne ausübt, kann zurzeit nicht abschließend beantwortet werden (vgl. Diskussion 4.1 und 4.2).

### **3.4 Die *Cupiennius salei* Gene *Notch* (*N*), *Delta-1* (*DI-1*) und *Delta-2* (*DI-2*)**

Bislang orientierte sich die Untersuchung des Spinnen Segmentierungsprozesses primär an der *Drosophila* Segmentierungskaskade. Doch stellt sich natürlich die Frage, ob nicht auch aus der Somitogenese der Vertebraten bekannte Prozesse eine Rolle bei der Segmentierung der Spinne spielen könnten. Eine wichtige Komponente der Vertebraten Segmentierung stellt die Notch-Signalkaskade dar (vgl. Einleitung).

Die Spinne verfügt neben einem *Notch* (*N*) Gen über zwei *Delta* (*DI-1* und *DI-2*) Gene, deren Rolle während der Neurogenese bereits analysiert wurde (Stollewerk 2002). Es soll nun geklärt werden, ob diese Gene, ähnlich wie bei Vertebraten, eine Funktion während des Spinnen Segmentierungsprozesses übernehmen.

#### **3.4.1 Die Expression von *Notch*, *DI-1* und *DI-2* in den Segmenten und der Wachstumszone**

Die Expression von *Notch* ist in den Segmenten, als auch in der Wachstumszone zu beobachten (Abb. 19 a-c). Innerhalb der Wachstumszone bilden sich zwei Bereiche stärkerer Expression aus, die durch einen schmalen Streifen von scheinbar *Notch* negativen Zellen getrennt werden (Abb. 19 b, c). Der posteriore Bereich starker *Notch* Expression umfasst einen Großteil der Wachstumszone, wobei wiederum ein Streifen stärkerer Färbung die Grenze zu den Zellen bildet, die scheinbar kein *Notch* ausprägen. In der anterioren Region der Wachstumszone liegt die zweite starke *Notch* Domäne, ebenfalls mit einer stärkeren, dieses Mal posterior liegenden, Grenze. Aus diesem Bereich entstehen die neuen Segmente, welche eine segmentale *Notch* Expression aufweisen (Abb. 19 b, c). Im Fall der segmentalen Ausprägung erscheint die posteriore Grenze stärker, innerhalb der Segmente wird die Expression in Richtung anterior schwächer. Die zuvor segmentale Expression geht später in ein neurales Muster über (Abb. 19 a). Dieser Übergang von einem segmentalen in

ein neurales Muster kann auch für *Dl-2* und *Dl-1* beobachtet werden (Abb. 19 d, e und g, h).

Die *Dl-2* Expression ist sehr stark, was die Analyse für den Bereich der Wachstumszone erschwert. Trotzdem wird deutlich, dass *Dl-2*, ähnlich wie *Notch*, in zwei Domänen innerhalb der Wachstumszone ausgeprägt wird. Diese Domänen sind wiederum durch einen Bereich, der fast frei von Expression ist getrennt (Abb. 19 e, f). Auch hier geht das Muster der Wachstumszone in eine segmentale Expression über. Wie auch für *Notch*, ist die posteriore Grenze stärker, obwohl dieser Effekt hier weniger deutlich erscheint.

Betrachtet man nun die Expression von *Dl-1*, treten einige Gemeinsamkeiten mit *Notch* und *Dl-2* auf, es sind aber auch große Unterschiede zu beobachten. So ähnelt die Expression von *Dl-1* in der Wachstumszone weder der von *Notch* noch von *Dl-2* (Abb. 19 h, i und j-l). Hier wird *Dl-1* zunächst in einer posterior liegenden Domäne ausgeprägt, die sich auflösen scheint und in eine streifenförmige Expressionsdomäne übergeht (Abb. 19 j, k). Diese Domäne verlagert sich in Richtung des anterioren Bereiches der Wachstumszone (Abb. 19 l). Eine solche dynamische Expression entspricht den Mustern, die bereits für die Paar-Regel Gen Homologe der Spinne beschrieben wurden (Ergebnisse 3.1.1, Damen et al. 2000). Wie auch im Fall von *Dl-1* beginnt deren Expression mit einer posterioren Domäne, die in eine streifenförmige Expression übergeht und in Richtung anterior gelangt. Dieser dynamische Zyklus wiederholt sich so lange, bis der Segmentierungsprozess abgeschlossen ist. Es gibt also eine Übereinstimmung der *Dl-1* Expression mit den Mustern der Paar-Regel Gen Homologe. Ob die Phasen der Expression gleich sind, also die Expression von *Dl-1* z. B. mit der von *hairy* oder *py-3* überlappt, kann nicht abschließend bestimmt werden, da für die Spinne kein geeignetes Doppelfärbungsprotokoll zur Verfügung steht.

Auch das *Dl-1* Gen wird segmental ausgeprägt (Abb. 19 h). Das dynamische Muster geht in ein segmentales Muster über, wobei, wie auch im Fall von *Notch*, die posteriore Grenze stärker erscheint.

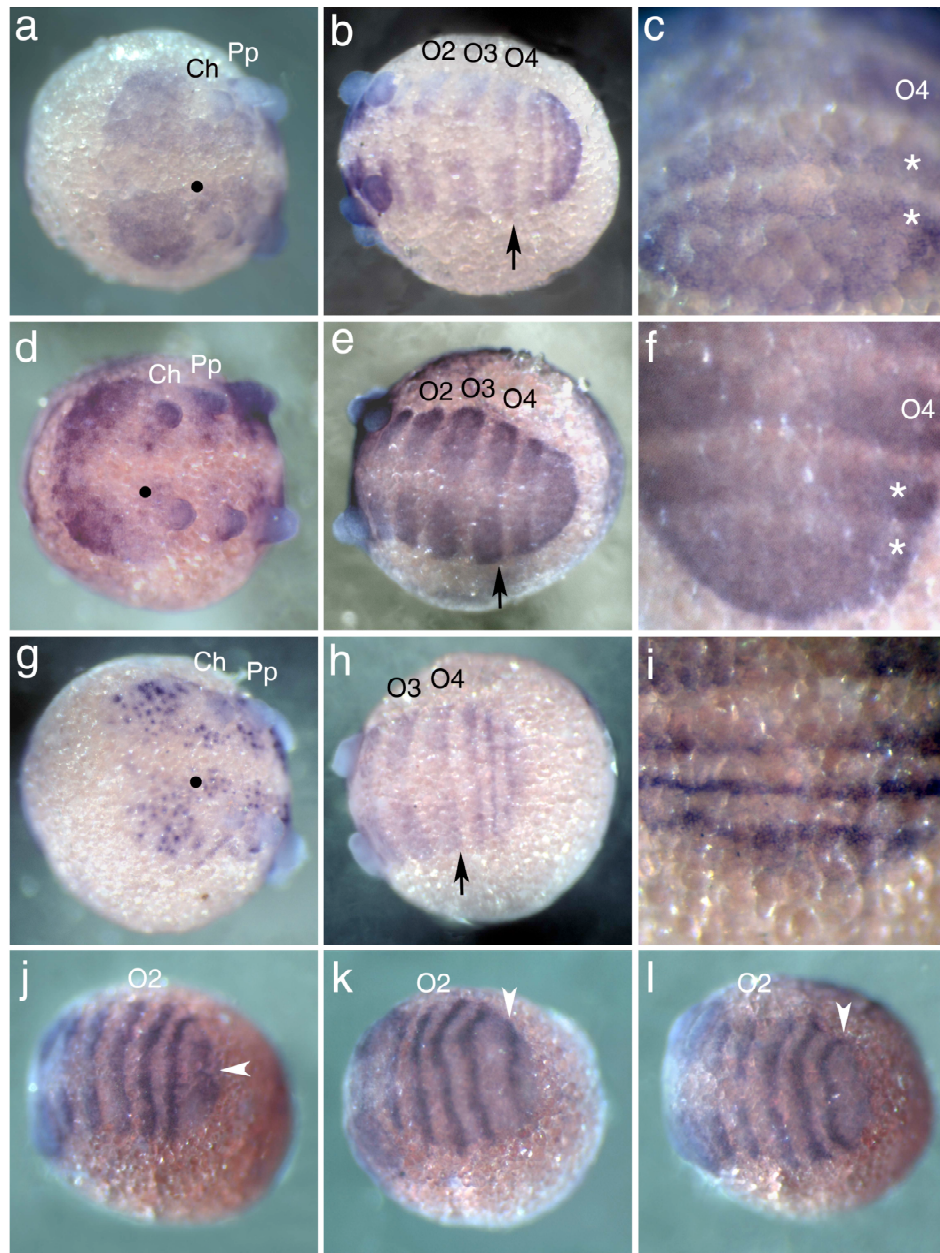
### Abbildung 19: Die Expression von *Notch*, *Delta-1* und *Delta-2*

Dargestellt ist die Expression von **(a-c)** *Notch*, **(d-f)** *Delta-2* und **(g-l)** *Delta-1*.

**(a-c)** die *Notch* Expression in einem Embryo mit vier opisthosomalen Segmenten (O4). **(a)** die neurale Expression im Kopflappen und in den ersten Segmenten (Kreis) entsteht ausgehend von der **(b)** segmentale Expression der opisthosomalen Segmente. *Notch* wird in der posterioren Hälfte des Segmentes stärker ausgeprägt (Pfeil). **(c)** die vergrößerte Ansicht der Wachstumszone zeigt, dass zwei Domänen (Sterne) über einen Bereich scheinbar *Notch* negativer Zellen getrennt werden.

**(d-f)** die *Delta-2* Expression eines Embryos mit vier opisthosomalen Segmenten (O4). Auch hier kann eine **(d)** neurale Expression (Kreis) und **(e)** eine segmentale Expression beobachtet werden (Pfeil). **(f)** vergrößerte Ansicht der Wachstumszone. Ähnlich wie bei *Notch* gibt es zwei Domänen der *Delta-2* Expression (Sterne).

**(g-i)** die Expression von *Delta-1* im **(a)** Kopflappen weist auf die neurale Funktion hin (Kreis). **(b)** die segmentale Expression ist in den posterioren Bereichen der Segmente stärker (Pfeil). Es wurden vier opisthosomale Segments gebildet. **(i)** vergrößerte Ansicht der Wachstumszone. **(j-k)** die dynamische *Delta-1* Expression. **(j)** eine *Delta-1* Expressionsdomäne wird im posterioren Bereich der Wachstumszone sichtbar. Diese Domäne geht **(k)** in eine streifenförmige Expression über und **(l)** gelangt in Richtung anterior. Die Pfeilspitzen in (j-k) markieren die dynamische Expression. Anterior ist, mit Ausnahme von (c, f, i), links. Im Falle von (c, f, i) ist anterior oben. Ch: Cheliceren, Pp: Pedipalpen, L1-L4: Laufbeine, O: Segmente des Opisthosomas.



### 3.4.2 *Notch*, *Dl-1* und *Dl-2* RNAi führen zu identischen Segmentierungsdefekten

Die Expressionsdaten für *Notch*, *Delta-1* und *Delta-2* lassen eine Beteiligung der Notch-Signalkaskade an der Spinnensegmentierung vermuten. Die genaue Rolle dieser Gene sollte nun mittels funktioneller Analysen bestimmt werden. Wie auch im Fall der *Krüppel* Gene (vgl. Ergebnisse 3.3.2) wurden mit dsRNA injizierte Embryonen zunächst mit *engrailed* als segmentalem Marker gefärbt. Auch die DAPI Färbungen zur Visualisierung der Morphologie fanden statt. Erneut wurde GFP dsRNA zur Kontrolle injiziert. Embryonen, die mit *Notch*, *Dl-1* oder *Dl-2* dsRNA injiziert wurden, weisen schwere Segmentierungsdefekte auf. Die Segmente, sowie deren Grenzen erscheinen nur noch unregelmäßig und deformiert, die Extremitäten sind stark verkürzt. (Abb. 20 und Tab. 2). Der RNAi Phänotyp für die drei Gene scheint hierbei identisch zu sein.

	Total (n)	Segmentierungs-Phänotyp	Keine Effekte	Unspezifische Effekte
<b>Keine Injektion</b>	89	0 (0%)	76 (85%)	13 (15%)
<b>GFP dsRNA</b>	50	0 (0%)	44 (88%)	6 (12%)
<b>Notch dsRNA</b>	160	101 (63%)	38 (24%)	21 (13%)
<b>Delta-1 dsRNA</b>	148	89 (60%)	37 (25%)	22 (15%)
<b>Delta-2 dsRNA</b>	156	89 (57%)	48 (31%)	19 (12%)

**Tabelle 2:** *Notch*, *Delta-1* und *Delta-2* RNAi führen zu Segmentierungsdefekten. Die Tabelle zeigt die totale Anzahl (n) injizierter Embryonen sowie den prozentualen Anteil an Embryonen mit Segmentierungsdefekten nach der Injektion von dsRNA. Kontrollembryonen wurden entweder nicht injiziert („keine Injektion“) oder mit dsRNA, korrespondierend zu GFP. Zudem ist der Anteil unspezifischer Effekte aufgeführt.

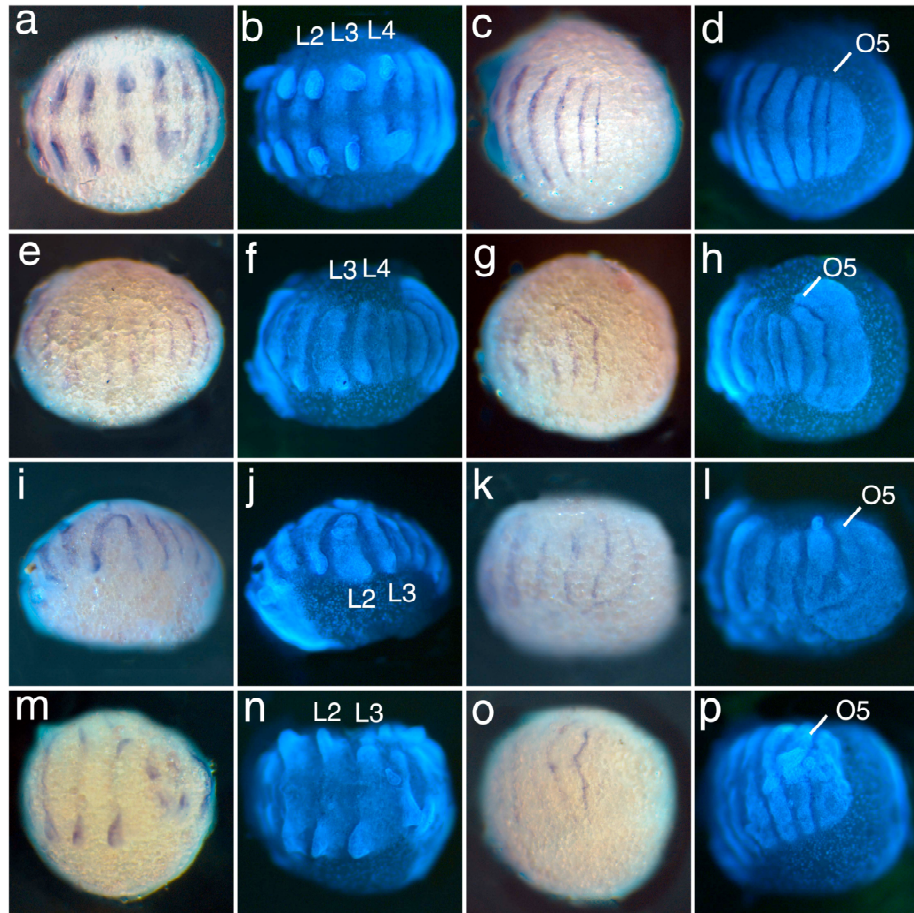
Wie durch die *engrailed* Färbungen deutlich wird, formieren sich die segmentalen Grenzen nicht mehr normal. In den Kontrollen sind noch deutliche, scharfe *engrailed* Expressionsgrenzen zu erkennen, die im Fall der RNAi Embryonen vollständig deformiert, sehr unregelmäßig und zum Teil schwächer wirken (Abb. 20 a, e, i, m). Die Segmente selber sind ebenfalls betroffen. Die Form, Größe und Breite der Segmente variiert, es treten ebenfalls Deformationen auf (Abb. 20 b, f, j, n). Ein weiterer Effekt betrifft die Wachstumszonen der RNAi Embryonen. Diese sind stark vergrößert und ebenfalls verformt (Abb. 20 d, h, l, p). Ein solcher Effekt könnte durch eine erhöhte Anzahl von Zellen in der Wachstumszone ausgelöst werden.

**Abbildung 20: *Notch*, *Delta-1* und *Delta-2* RNAi führen zu identischen Segmentierungsphänotypen**

**(a-d)** Kontrollembryonen mit GFP dsRNA injiziert, **(e-h)** *Notch* RNAi Embryonen, **(i-l)** *Delta-1* RNAi Embryonen und **(m-p)** *Delta-2* RNAi Embryonen. Die Embryonen wurden mit *engrailed* und zusätzlich für DAPI (b, d, f, h, j, l, n, p) gefärbt. Dargestellt sind jeweils die Segmente des Prosomas (a-b, e-f, i-j, m-n) sowie die des Opisthosomas (c-d, g-h, k-l, o-p).

**(a-d)** Kontrollembryonen. Es sind scharfe *engrailed* Grenzen erkennbar und auch die Wachstumszone entwickelt sich normal. **(e-p)** im Fall der *Notch*, *Delta-1* oder *Delta-2* RNAi Embryonen scheinen identische Defekte aufzutreten. So sind **(e, i, m)** die segmentalen Grenzen deformiert und die *engrailed* Färbung schwächer. Die Segmente **(f, j, n)** variieren in Breite und Größe und haben ihre reguläre Form verloren. **(h, l, p)** die Wachstumszonen der RNAi Embryonen sind ebenfalls deformiert und erheblich vergrößert. Anterior ist in allen Fällen links. L1-L4: Laufbeine, O: Segmente des Opisthosomas.

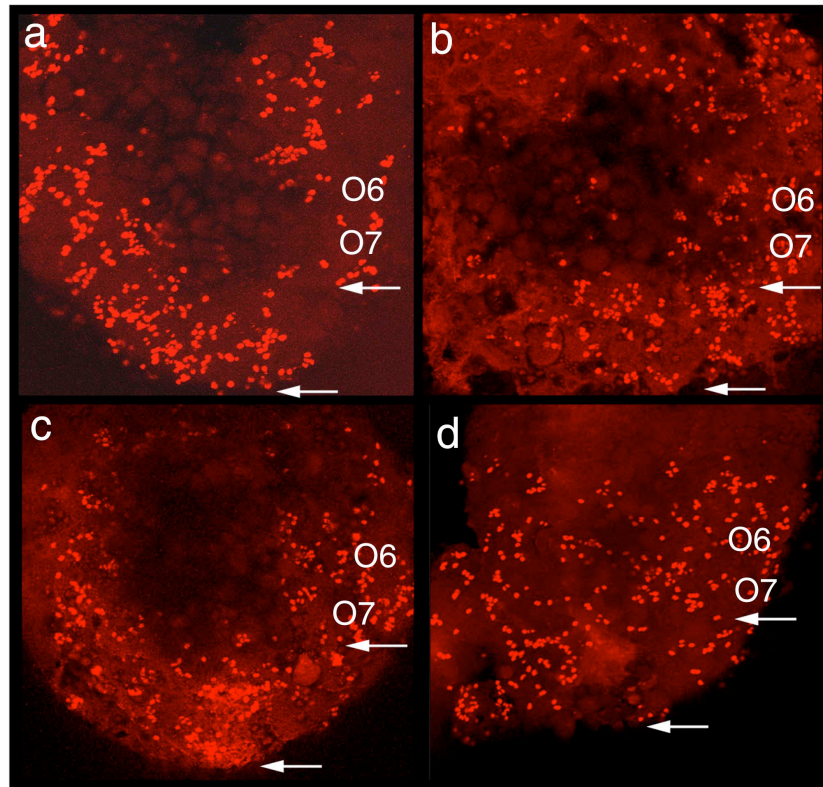




**Abbildung 21: Die Zellteilungsmuster in den Wachstumszonen von *Notch*, *Dl-1* und *Dl-2* RNAi Embryonen unterscheiden sich nicht von denen der Kontrollembryonen**

(a-d) dargestellt sind Flachpräparate von Embryonen, die mit dem Anti-Phospho-Histon-3 Antikörper gefärbt wurden. Die Bereiche zwischen den Pfeilen markieren die Wachstumszonen. (a) GFP dsRNA injizierter Kontrollembryo sowie RNAi Embryonen für (b) *Dl-1*, (c) *Dl-2* und (d) *Notch*. Es wurde die Anzahl der mitotisch aktiven Zellen bestimmt. Hierbei treten keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl sich teilender Zellen in den Wachstumszonen auf (Stollewerk et al. 2003). Anterior ist in allen Fällen oben.

Die Abbildung wurde mir von Frau Dr. Angelika Stollewerk zur Verfügung gestellt und wurde unter Stollewerk et al. (2003), als Teilpublikation dieser Arbeit, veröffentlicht.



Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurde die Anzahl der mitotisch aktiven Zellen in den Wachstumszonen von Kontroll- und RNAi Embryonen verglichen (Abb. 21). Hierbei zeigte sich, dass keine signifikanten Unterschiede in der Zahl der sich teilenden Zellen auftraten. Somit scheint der Grund für die vergrößerten und deformierten Wachstumszonen eher in Musterbildungsdefekten zu liegen, als in einer Hyperproliferation von Zellen.

*Notch*, *Dl-1* und *Dl-2* spielen also eine wichtige Rolle im Segmentierungsprozess der Spinne. Dabei können zunächst zwei Hauptfunktionen unterschieden werden. Zum einen sind die Gene an der Musterbildung in der Wachstumszone beteiligt. Zum anderen haben sie eine Funktion bei der Bildung der einzelnen Segmente sowie der Etablierung der Segmentgrenzen. Jedoch wird die Anzahl der Segmente scheinbar nicht über die Notch-Signalkaskade bestimmt. Es konnten keine RNAi Embryonen beobachtet werden, bei denen die Zahl der Segmente variierte.

### 3.4.3 Die *hairy* Expression ist in *Notch*, *Dl-1* und *Dl-2* RNAi Embryonen gestört

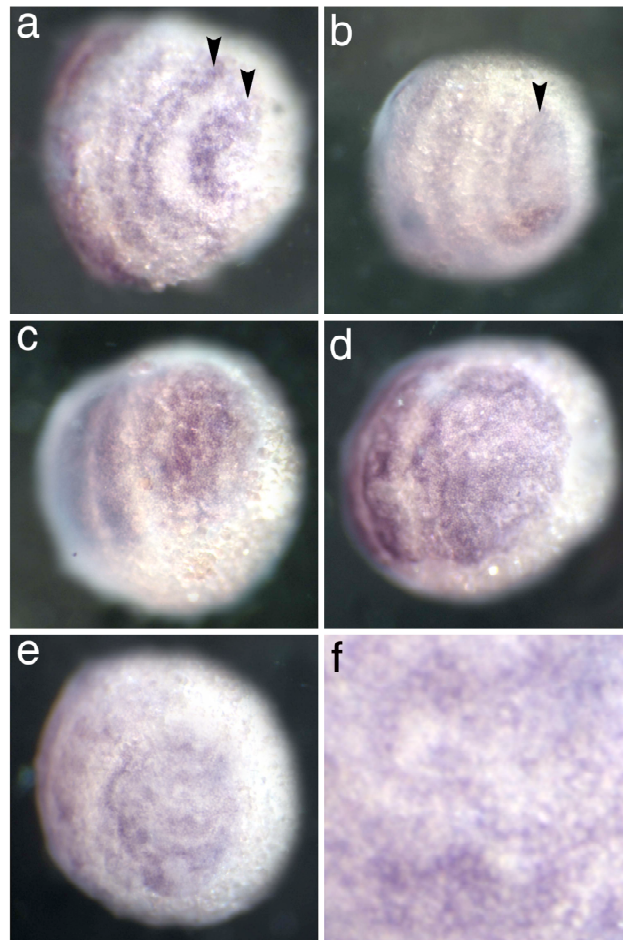
Es stellte sich nun die Frage, ob über die Notch-Signalkaskade auch die Expression anderer an der Segmentierung der Spinne beteiligter Gene gesteuert wird. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, werden die *hairy/Enhancer of split (h/E(spl))* Gene der Vertebraten via *Notch* reguliert. Um dieses nun für die Spinne zu untersuchen, wurden mit *Notch*, *Dl-1* und *Dl-2* dsRNA injizierte Embryonen für *hairy* gefärbt (Abb. 22).

Das *hairy* Gen der Spinne wird, wie bereits mehrfach erwähnt, in dynamischen Streifen innerhalb der Wachstumszone ausgeprägt (Damen et al. 2000). Dieses Muster bleibt auch im Fall der Kontrollembryonen erhalten (Abb. 22 a, b). Ein anderes Bild ergibt sich bei den RNAi Embryonen. Hier ist die *hairy* Expression in der Wachstumszone vollständig desorganisiert (Abb. 22 c-f). Einzelne Streifen sind nicht mehr erkennbar, *hairy* positive Zellen sind über die Wachstumszone verteilt. Wiederum tritt der gleiche Effekt bei allen drei Genen auf.

Eine zusätzliche Funktion der Notch-Signalkaskade liegt also in der Organisation der dynamischen *hairy* Expression. Um nun den regulatorischen Einfluss von *Notch* und *Delta* auf weitere Spinnen Paar-Regel Gen Homologe zu untersuchen, wurden *Notch* und *Dl-1* RNAi Embryonen für *eve*, ein primäres Paar-Regel Gen Homolog der Spinne

**Abbildung 22: Die dynamische Expression von *hairy* ist in *Notch* und *Delta* RNAi Embryonen gestört**

(a, b) Kontrollembryonen mit GFP dsRNA injiziert weisen die dynamische Expression von *hairy* auf (Pfeilspitzen). Im Falle der (c) *Notch*, (d) *DI-1* oder (e) *DI-2* RNAi Embryonen ist das *hairy* Muster desorganisiert, reguläre Expressionsdomänen sind nicht mehr erkennbar. (f) vergrößerte Ansicht der Wachstumszone des Embryos aus (e). *hairy* positive Zellen sind über die gesamte Wachstumszone verteilt. Anterior ist in allen Fällen links.

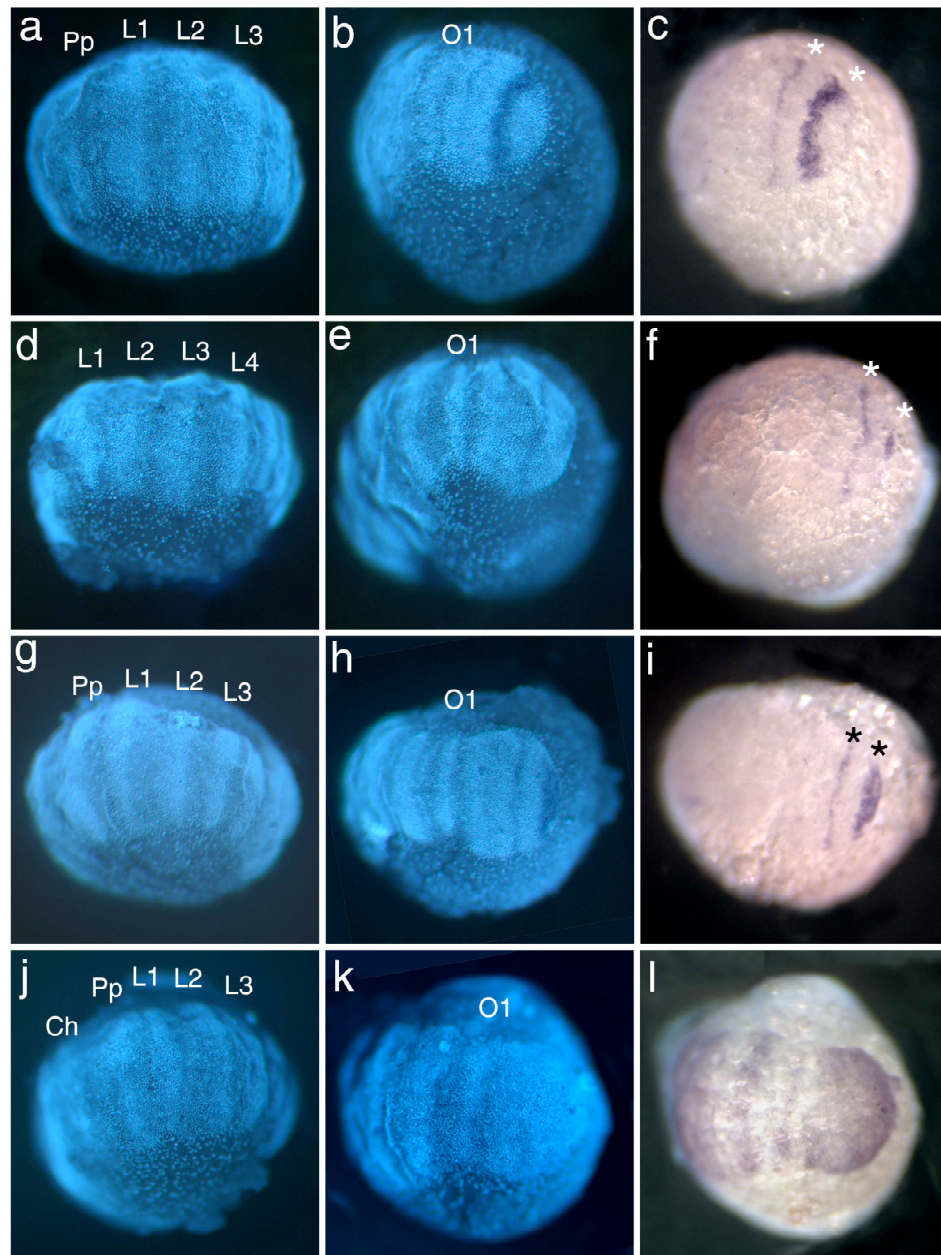


**Abbildung 23: Die Expression von *even-skipped* ist in *Notch* und *Delta* RNAi Embryonen nicht gestört**

(a-c) Kontrollembryonen mit GFP dsRNA injiziert (d-f) und (j-l) *Notch* RNAi Embryonen und (g-i) *Delta-1* RNAi Embryonen. Die Embryonen in (a) bis (i) wurden für *even-skipped* und die Embryonen in (j) bis (l) für *hairy* gefärbt. Eine zusätzliche DAPI Färbung (a-b, d-e, g-h, j-k) wurde durchgeführt.

(a-c) die Kontrollen entwickeln sich normal. (c) die dynamische *even-skipped* Expression in der Wachstumszone wurde über Sterne (\*) markiert. (d-i) trotz des Auftretens der *Notch* (d-e) und *Delta-1* (g-h) RNAi Phenotypen, ist (f, i) die *even-skipped* Expression in der Wachstumszone nicht verändert (Sterne). (j-l) werden *Notch* RNAi Embryonen des gleichen Ansatzes allerdings für *hairy* gefärbt, treten neben (j, k) den morphologischen Phenotypen auch die (l) Störungen der dynamischen Expression auf, das Muster ist desorganisiert. Anterior ist links. Ch: Cheliceren, Pp: Pedipalpen. L1-L4: Laufbeine, O: Segmente des Opisthosomas.







(Damen et al. 2000), gefärbt (Abb. 23). Die Expression von *eve* ist in *Notch* und *Dl-1* RNAi Embryonen nicht gestört. Wie auch in den mit GFP dsRNA injizierten Kontrollembryonen, bleibt das *eve* Muster dort erhalten (Abb. 23 c, f, i), obwohl die DAPI Färbungen eindeutig den *Notch/Delta* Phenotyp zeigen (Abb. 23 d-e und g-h). Bei Embryonen des gleichen Injektions-Ansatzes, die für *hairy* gefärbt wurden, traten die erwarteten Desorganisationen des Expressionsmusters auf (Abb. 23 j-l). Dieses zeigt, dass der RNAi Effekt stark genug war, um das *hairy* Muster beeinflussen zu können. Die Tatsache, dass das *eve* Muster nicht gestört war, lässt vermuten, dass *eve* nicht von *Notch* reguliert wird (vgl. Diskussion 4.1).

### 3.5 Das *Cupiennius salei* Suppressor of Hairless (*Su(H)*) Gen

Eine wichtige Komponente der Notch-Signalkaskade stellt *Su(H)* dar (vgl. Einleitung). Mit der Bindung eines Liganden (*Delta*, *Serrate*) wird die intrazelluläre Domäne von *Notch* (NICD) abgespalten und kann im Kern mit *Su(H)* interagieren. Diese Interaktion hat zur Folge, dass die Transkription der Zielgene vonstatten gehen kann. In Abwesenheit der NICD wirkt *Su(H)* als Repressor (Baron et al. 2002). Allerdings gibt es auch Hinweise auf alternative, *Su(H)* unabhängige Wege. An diesen scheint das Protein *Deltex* beteiligt zu sein, welches mit *Notch* interagiert und so die Notch-Signalkaskade mit dem Wnt-Signalweg verbindet (zur Übersicht; Martinez Arias et al. 2002).

Cs	AAKTLFISDSKDKRKHFMFLSVKMFYANGEDLGMFQSKRIKVISKPSKKKQSLKNADLCIAS	
Dm	-----G--H-I-V-N-----	
Ag	-----GS-H-I-V-----	
Maus	T----Y-----G-SD-I-V-L-----	
Cs	GTKVALFNRLRSQTVSTRYLHVENGNFHASSTQWGAFTIHLDDNESESEEEFTVR	(aa72-192)
Dm	--N-----H-----Q--	(aa198-318)
Ag	-----N-H-----Q--	(aa110-230)
Maus	-----G-----Q-----Y-----D---G-----	(aa110-230)

**Abbildung 24:** Sequenzvergleich verschiedener *Su(H)* Proteine. Bindestrichen weisen auf identische Aminosäuren (aa) hin. Zugangsnummern der Sequenzen: Dm-*Su(H)*: NP\_788069, Ag-*Su(H)*: XP\_319690, Maus: AAH51387. Cs: *Cupiennius salei*, Dm: *Drosophila melanogaster*, Ag: *Anopheles gambiae*,

Die *Notch* und *Delta* Gene der Spinne sind zwar eindeutig am Segmentierungsprozess beteiligt (vgl. Ergebnisse 3.4 und Diskussion 4.3), doch ist bisher noch ungeklärt, inwieweit auch *Su(H)* involviert ist, oder *Notch* über alternative Wege wirkt.

Das 663bp große Fragment von *Su(H)* wurde mir von Dr. Wim Damen zur Verfügung gestellt. Der Vergleich der Aminosäuren Sequenz mit Su(H) Proteinen anderer Arthropoden sowie dem Homolog aus der Maus zeigt, dass *Su(H)* in hohem Maße konserviert ist (Abb. 24). Die *Cupiennius salei* *Su(H)* Sequenz wird in Anhang 6 aufgeführt.

### 3.5.1 Die frühe Expression von *Su(H)* ist ubiquitär

*Su(H)* wird in den frühen Stadien der Entwicklung ubiquitär ausgeprägt. Hierbei kann die Expression in allen Segmenten, der Wachstumszone und auch in den Beinen beobachtet werden (Abb. 25 a, b). In späteren Stadien bleibt eine schwächere, ebenfalls ubiquitäre Expression erhalten, doch kommt es vor allem im Bereich der Beine und des Neuroektoderms zur Akkumulation von Transkripten (Abb. 25 c,d).

Die Funktion als Aktivator der Transkription kann *Su(H)* nur dann ausüben, wenn auch die Notch-Signalkaskade aktiv ist (Baron et al. 2002). Es reicht also aus, den Rezeptor (*Notch*) oder die Liganden (*Delta*, *Serrate*) in einem spezifischen Muster auszuprägen bzw. zu aktivieren. Die spätere Expression von *Su(H)* in den Beinen und dem Neuroektoderm ist wohl auf eine erhöhte *Notch* Aktivität während der Entwicklung dieser Strukturen zurückzuführen.

### 3.5.2 *Su(H)* RNAi führt zu schweren Segmentierungsdefekten

Ist *Su(H)* an der Spinnensegmentierung beteiligt, oder agiert *Notch* über alternative Wege? Um diese Frage zu beantworten, wurden funktionelle Untersuchungen mittels RNAi durchgeführt. Für den Fall alternativer Weg würde man erwarten, dass ein potentieller *Su(H)* Phenotyp schwächer ist, als der von *Notch* und *Delta* oder nur Teilaspekte dieser Phentypen auftreten. Zur Auswertung möglicher RNAi Phentypen wurden die mit *Su(H)* und GFP dsRNA injizierten Embryonen für *engrailed* und mit DAPI gefärbt.

Die *Su(H)* RNAi Embryonen weisen schwere Segmentierungsdefekte auf (Abb. 26 und Tabelle 3). So sind die Embryonen stark verkürzt, es bilden sich nur die drei ersten opisthosomalen Segmente. Diese erscheinen zudem stark reduziert und wesentlich schwächer ausgeprägt als in den Kontrollen (Abb. 26 b, e). Auch im weiteren Verlauf der Entwicklung wird der Segmentierungsprozess nicht wieder aufgenommen. Zudem sind die Wachstumszonen der *Su(H)* RNAi Embryonen betroffen. Während bei den Kontrollembryonen noch kompakte Wachstumszonen zu beobachten sind, erscheinen die der RNAi Embryonen ausgedünnt, als ob die Zellen den Zusammenhang verloren hätten und nun über einen größeren Bereich verteilt sind (Abb. 26 c, f).

Aber auch die Segmente des Prosomas bilden sich nicht normal. Die Extremitäten sind stark verkürzt oder fehlen vollständig, die Segmente wirken deformiert und schmäler als in den Kontrollen (Abb. 26 a-c, d-e).

Weder im Prosoma noch im Opisthosoma kann die Expression von *engrailed* beobachtet werden. Das lässt auf eine gestörte anterior-posterior Polarität der Segmente schließen und könnte eine Erklärung für die schmäler wirkenden Segmente sein.

	Total (n)	Segmentierungs Phenotyp	Keine Effekte	Unspezifische Effekte
<b>Keine Injektion</b>	56	0 (0%)	52 (93%)	4 (7%)
<b>GFP dsRNA</b>	76	0 (0%)	69 (91%)	7 (9%)
<b>Su(H) dsRNA</b>	173	54 (31%)	102 (59%)	17 (10%)

**Tabelle 3:** *Suppressor of Hairless* RNAi verursacht Segmentierungsdefekte. Gezeigt sind die absoluten Zahlen (n) sowie der prozentuale Anteil an Embryonen mit schweren Segmentierungsdefekten nach der Injektion von *Su(H)* dsRNA. Kontrollembryonen wurden entweder nicht injiziert („keine Injektion“) oder mit dsRNA, korrespondierend zu GFP. Zudem ist der Anteil unspezifischer Effekte aufgeführt.

Der *Su(H)* RNAi Phenotyp unterscheidet sich in einigen Punkten von den *Notch* oder *Delta* RNAi Effekten (vgl. Ergebnisse 3.4.2). Dieses zeigt sich vor allem in der reduzierten Anzahl der Segmente und der fehlenden *engrailed* Expression. Die Gründe hierfür werden in der Diskussion (Diskussion 4.3) besprochen.

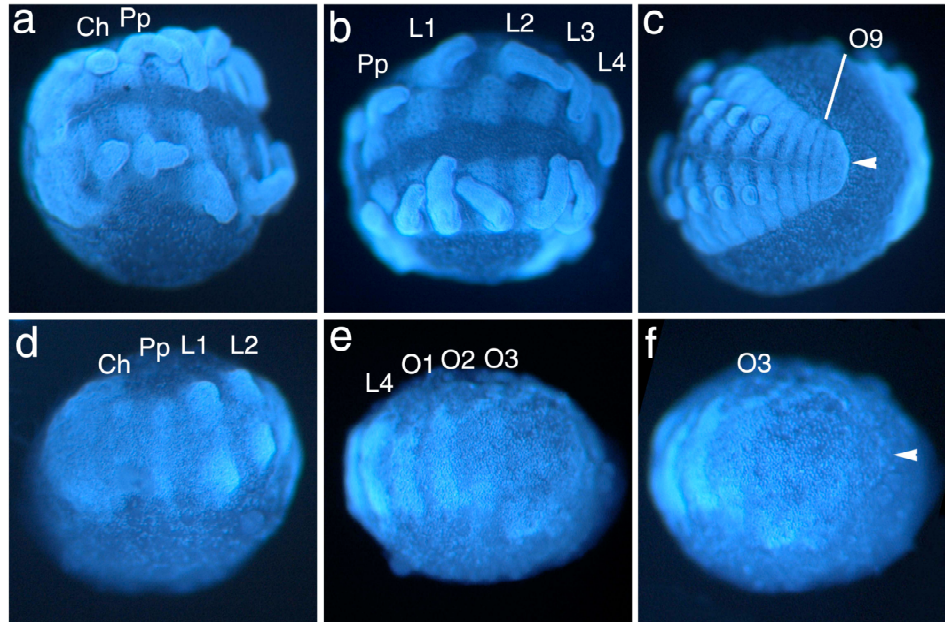
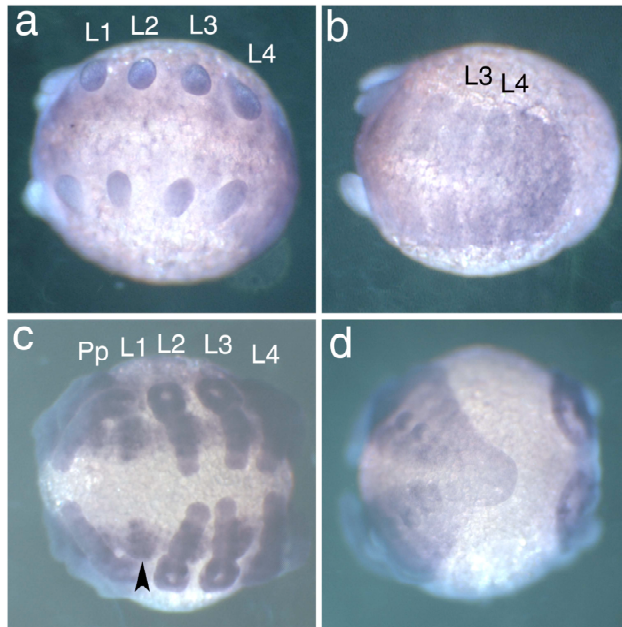
### Abbildung 25: Die Expression von *Su(H)* ist ubiquitär

Die Expression von *Su(H)* ist während verschiedener Stadien der Entwicklung ubiquitär. **(a-b)** Embryo mit vier opisthosomalen Segmenten. Es kann eine Färbung in **(a)** den Segmenten des Prosomas, den Beinen sowie **(b)** den Segmenten des Opisthosomas beobachtet werden. **(c-d)** in älteren Stadien bleibt die ubiquitäre Färbung erhalten, wobei **(c)** nun eine stärkere Expression in den Beinen und dem Neuroektoderm (Pfeilspitze) auftritt. Anterior ist in allen Fällen links. Pp: Pedipalpen. L1-L4: Laufbeine, O: Segmente des Opisthosomas.

### Abbildung 26: *Su(H)* RNAi führt zu starken Segmentierungsdefekten

Dargestellt sind **(a-c)** GFP dsRNA injizierte Kontrollembryonen sowie **(d-f)** *Su(H)* RNAi Embryonen. Sämtliche Embryonen wurden für *engrailed* und mit DAPI gefärbt, wobei nur die DAPI Färbung gezeigt ist.

**(a-c)** Kontrollembryo aus verschiedenen Perspektiven. Der **(a)** Kopfbereich, **(b)** die Segmente des Prosomas und des **(c)** Opisthosomas entwickeln sich normal. Bei den **(d-f)** *Su(H)* RNAi Embryonen sind **(d)** die Extremitäten verkürzt, **(e)** die Segmente wirken reduziert und **(e, f)** der Segmentierungsprozess stoppt nach der Bildung des dritten opisthosomalen Segmentes. Zusätzlich wirken **(f)** die Wachstumszonen der RNAi Embryonen ausgedünnt, wie über einen größeren Bereich verteilt. Die Pfeilspitzen (c, f) markieren das Ende der Wachstumszonen. Anterior ist in allen Fällen links. Ch: Cheliceren, Pp: Pedipalpen. L1-L4: Laufbeine, O: Segmente des Opisthosomas.



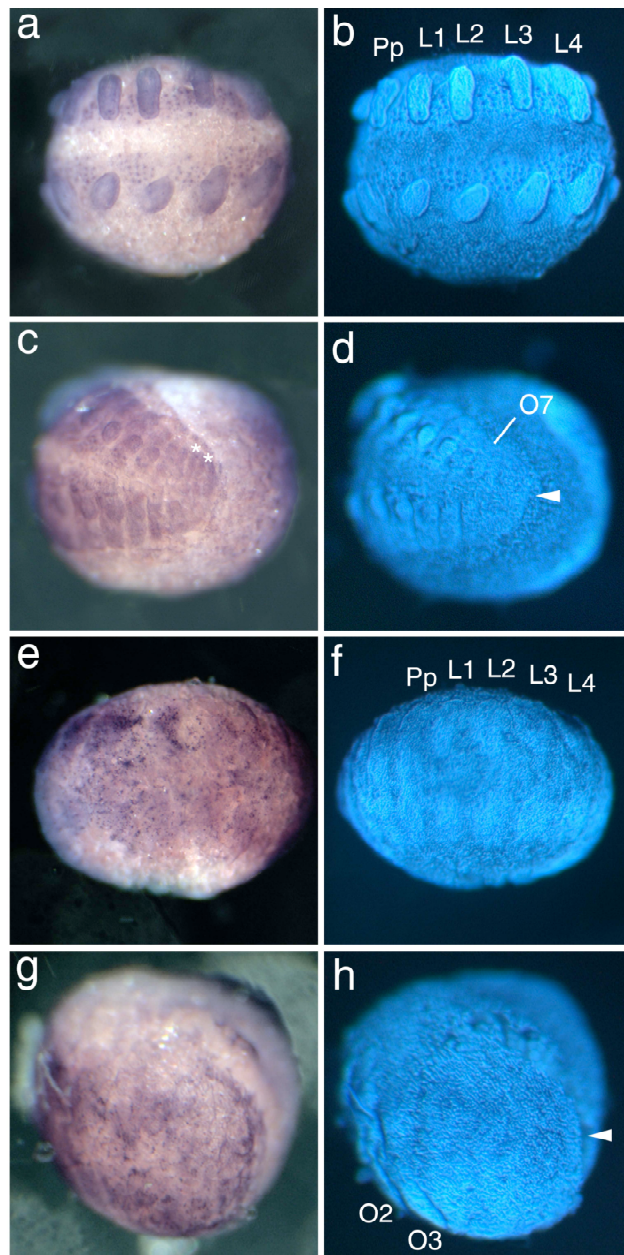
### Abbildung 27: Die Expression von *Dl-1* ist in *Su(H)* RNAi Embryonen gestört

Dargestellt ist die Expression von *Dl-1* bei **(a-d)** mit GFP dsRNA injizierten Kontrollembryonen sowie **(e-h)** *Dl-1* RNAi Embryonen. Zusätzlich wurden die Embryonen (b, d, f, h) mit DAPI gefärbt.

**(a-d)** bei den Kontrollembryonen erscheint die **(a)** neurale Expression und auch die **(c)** dynamische Expression (Sterne) von *Dl-1* normal für dieses Stadium der Entwicklung. Es treten (b, d) keine Segmentierungsdefekte auf.

**(e-h)** die *Su(H)* RNAi Embryonen weisen nicht nur **(f, h)** schwere Segmentierungsdefekte auf, sondern auch die Expression von *Dl-1* ist gestört. So scheinen im **(e)** Prosoma mehr Zellen *Dl-1* auszuprägen, als dies der Fall bei den Kontrollen ist (a). **(g)** auch im Bereich der Wachstumszone findet keine organisierte *Dl-1* Expression mehr statt.

Die Pfeilspitzen (d, h) markieren das Ende der Wachstumszonen. Anterior ist in allen Fällen links. L1-L4: Laufbeine, O: Segmente des Opisthosomas.



### 3.5.3 *Su(H)* RNAi führt zur Desorganisation des *Delta-1* Musters

Um die Frage klären zu können, ob auch die dynamische *Dl-1* Expression von *Su(H)* abhängt, wurden *Su(H)* RNAi Embryonen für *Dl-1* gefärbt.

In solchen Embryonen ist das *Dl-1* Muster vollständig gestört (Abb. 27). Eine dynamische Expression ist nicht mehr erkennbar und auch die „punktförmige“, neuroektodermale Expression erscheint nicht mehr regulär (Abb. 27 e, g). Vielmehr sind *Dl-1* positive Zellen über das gesamte Prosoma verteilt (Abb. 27 e). Ein Grund hierfür könnte in regulatorischen Interaktionen zwischen *Notch* und *Delta* liegen. Die Expression von *Delta* wird, unter anderem während der Neurogenese, von *Notch* via *Su(H)* und weiteren Genen unterdrückt (Artavanis-Tsakonas et al. 1999, Baron et al. 2002). Fällt nun diese Unterdrückung weg, da *Su(H)* ausgeschaltet wurde, kann *Delta* nicht mehr spezifisch reguliert werden, was zu dem beobachteten Muster führen könnte.

*Su(H)* ist also an der Organisation des dynamischen als auch des neuralen *Dl-1* Musters beteiligt.

## 3.6 Das *Cupiennius salei* *Fringe* (*Fng*) Gen

Eine Schlüsselkomponente der Notch-Signalkaskade ist *Fringe* (vgl. Einleitung). Zwar ist *Fng* für die eigentliche Übertragung des Notch Signals nicht essentiell, doch kann über *Fng* die Modifikation von Notch und somit eine Modulation des Signals stattfinden. Wie auch *Su(H)* ist *Fng* an der Vertebraten Segmentierung beteiligt, und dadurch auch interessant in Hinsicht auf den Segmentierungsprozess der Spinne.

Ausgehend von einem 259bp Fragment, welches mir von Dr. Wim Damen zur Verfügung gestellt wurde, erbrachte eine 3' RACE-PCR ein Fragment von 673bp. Dieses enthält einen ORF von 152 Aminosäuren sowie 218bp der 3' nicht kodierenden Region (3'UTR). Der Sequenzvergleich (Abb. 28) zeigt, dass die *Fringe-like* Domänen von *Cupiennius salei* und *Schistocerca gregaria* zu 82% identisch sind. Im Falle von *Drosophila melanogaster* stimmen 74% und bei *Gallus gallus* noch 51% überein. Die vollständige Sequenz wird in Anhang 7 aufgeführt.



Cs	SPQEDWYLGKPSIRSPLIICRDEK...QKNISFWFATGGAGFCISRALALKMLPIASGG
Sg	N-E-----A----LN-NTA...-N-----L-----M-V----
Dm	--SV-----HLDSKNTTTN-K-S-----S---TL-----G--
Gallus	--SQ-V-V-R--LDH-IEAADHVQSDGSKTSVS-----G-----S-I--LG
Cs	KFISIGEKIRLPDDVTMGYIIIEHILKKKLTVVDQFHSHFEPMKFLKPDTFSDQ (aa 20-137)
Sg	-----M-Q-K---IE-----L-----R---IQ-- (aa 58-171)
Dm	-----D---L-----F-----L-VP-----N-----L-----IRQ---S-- (aa 245-371)
Gallus	N---TA-RV-----C-I-----GI-EV-LHSPL-----L-NLQR-QGESVLQ- (aa 210-327)

**Abbildung 28:** Sequenzvergleich verschiedener Fringe Proteine. Bindestrichen weisen auf identische Aminosäuren (aa) hin, Punkte symbolisieren Lücken in der Sequenz. Zugangsnummern: Sg-*Fng*: AAF17565, Dm-*Fng*: Q24342, Gallus *Radical Fringe*: AAC60107. Cs: *Cupiennius salei*, Sg: *Schistocerca gregaria* Dm: *Drosophila melanogaster*, Gallus: *Gallus gallus*, aa: Aminosäure.

### 3.6.1 Die Expression von *Fringe* korreliert mit der Bildung von Segmentgrenzen

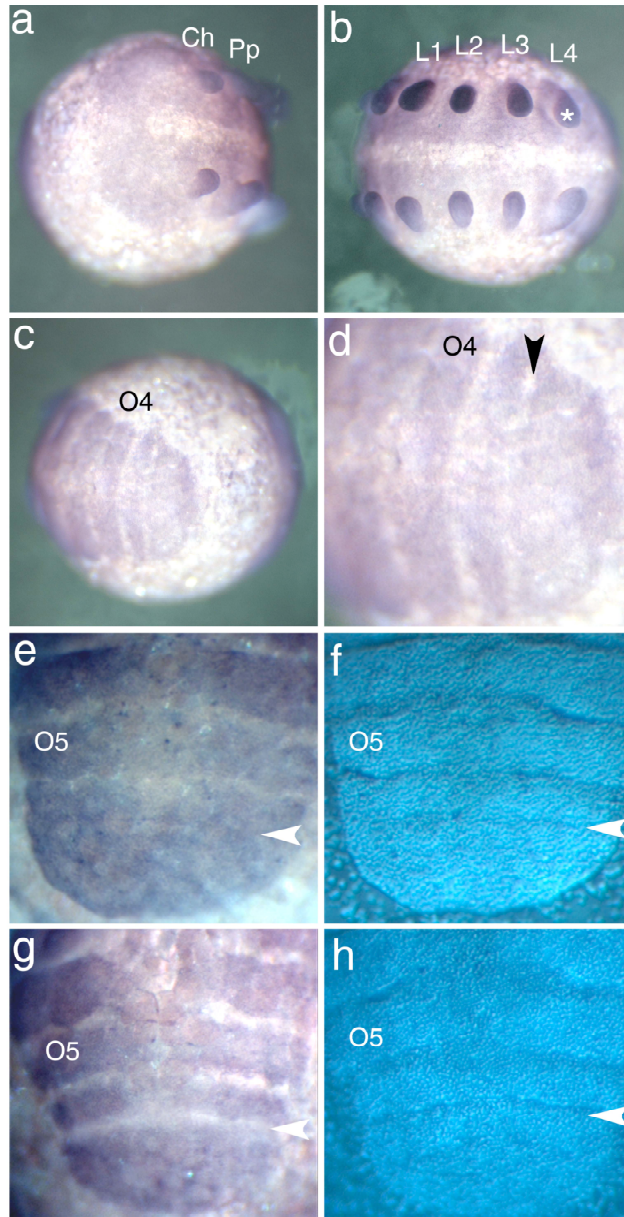
Die Expression von *Fng* erscheint zunächst ubiquitär. Die Segmente des Prosomas und der Kopfbereich weisen eine schwache Färbung auf, die nur in den distalen Regionen der Beine stärker zu sein scheint (Abb. 29 a-b). Im Opisthosoma tritt eine segmentale Färbung auf, ohne dass stärkere Bereiche der Expression sichtbar wären (Abb. 29 c). Dies gilt allerdings nicht für die Wachstumszone, wo zwei Domänen erkennbar sind (Abb. 29 c-d). Die posterior liegende Domäne füllt einen Großteil der Wachstumszone aus und wird über einen Bereich scheinbar *Fng* negativer Zellen von einer anterioren, segmental wirkenden Domäne getrennt. Der Bereich, der diese beiden Domänen separiert, entsteht allerdings erst mit der Bildung einer neuen Segmentgrenze (Abb. 29 e-h). So ist zunächst die gesamte Wachstumszone gefärbt, die morphologische Segmentgrenze ist zu diesem Zeitpunkt nur schwach erkennbar (Abb. 29 e-f). Kurz darauf entsteht ein Streifen von Zellen, die kein *Fng* ausdrücken. Im gleichen Bereich entsteht eine Einschnürung von Zellen und eine neue Segmentgrenze entsteht (Abb. 29 g-h).

### Abbildung 29: Die Expression von *Fringe*

**(a-d)** die Expression von *Fringe* in einem Embryo mit vier opisthosomalen Segmenten erscheint im **(a)** Kopfbereich und dem **(b)** Prosoma ubiquitär. Allerdings kann eine stärkere Färbung in den distalen Bereichen der Extremitäten beobachtet werden (Stern in b). **(c)** die Segment des Opisthosomas weisen ebenfalls eine durchgehende Färbung auf, wobei **(d)** aus der vergrößerten Darstellung der Wachstumszone hervorgeht, dass hier die Expression in zwei Domänen unterteilt ist. Die Pfeilspitze (d) weist auf den Bereich, der frei von *Fringe* Expression ist.

**(e-h)** die Ausprägung von *Fringe* kann mit der Bildung der Segmentgrenzen korreliert werden. Die Embryonen in (f) und (h) wurden zusätzlich zu *Fringe* mit DAPI gefärbt. **(e, f)** die *Fringe* Expression in der Wachstumszone scheint durchgehend zu sein. **(f)** die zukünftige morphologische Segmentgrenze ist schwach erkennbar (Pfeilspitze). **(g, h)** Embryo, der zwei Stunden später fixiert wurden. **(g)** die Aufteilung der *Fringe* Expression in zwei Domänen ist nun gut erkennbar (Pfeilspitze) und scheint **(h)** im gleichen Bereich wie die morphologische Grenze (Pfeilspitze) zu sein.

Die Pfeilspitzen in (e-f) markieren jeweils den gleichen Bereich. (a-d) Anterior ist links; (e-h) anterior ist oben. Ch: Cheliceren, Pp: Pedipalpen. L1-L4: Laufbeine, O: Segmente des Opisthosomas.



### 3.6.2 *Fng* RNAi führt zu Segmentierungsphenotypen

Das beschriebene Expressionsmuster legt die Vermutung nah, dass *Fng* an der Segmentierung der Spinne beteiligt sein könnte. Über funktionelle Analysen sollten nun diese möglichen Funktionen bestimmt werden. Hierbei steht auch die Frage im Vordergrund, ob *Fng* für alle Aspekte der Notch-Signalkaskade notwendig ist, oder ob *Fng* unabhängige Funktionen zu beobachten sind. Im Falle solcher unabhängiger Funktionen, sollte der *Fng* RNAi Phenotyp nicht alle Gesichtspunkte der *Notch* RNAi Phenotypen widerspiegeln.

	Total (n)	Segmentierungs Phenotyp	Keine Effekte	Unspezifische Effekte
<b>Keine Injektion</b>	158	0 (0%)	134 (85%)	24 (15%)
<b>GFP dsRNA</b>	161	0 (0%)	143 (89%)	18 (11%)
<b><i>Fng</i> dsRNA</b>	437	220 (50%)	179 (41%)	38 (9%)

**Tabelle 4:** *Fng* RNAi verursacht Segmentierungsdefekte. Gezeigt sind die absoluten Zahlen (n) sowie der prozentuale Anteil an Embryonen mit Segmentierungsdefekten nach der Injektion von *Fng* dsRNA. Kontroll-embryonen wurden entweder nicht injiziert („keine Injektion“) oder mit dsRNA, korrespondierend zu GFP. Zudem ist der Anteil unspezifischer Effekte aufgeführt.

Die mit *Fng* dsRNA injizierten Embryonen sowie auch die Kontrollen wurden zunächst für *engrailed* und DAPI gefärbt. Hierbei zeigte sich, dass bei etwa 50% der *Fng* RNAi Embryonen Segmentierungsdefekte auftraten (Tabelle 4 und Abb. 30). So sind die Segmente deformiert, variieren zum Teil in ihrer Größe und Form (Abb. 30 j-l). Auch die Expression von *engrailed* ist gestört. Zwar sind noch relativ scharfe anteriore Expressionsgrenzen zu beobachten, doch sind die Streifen weniger definiert als in den Kontrollen (Abb. 30 a-c und g-i). Dies betrifft vor allem die posterioren Grenzen der *engrailed* Expression. Diese erscheinen weniger scharf und wirken zum Teil wie aufgelöst (Abb. 30 c, i). Im Vergleich zu den Kontrollembryonen fällt zudem auf, dass die Extremitäten stark verkürzt sind und dass die Trennung der beiden Seiten des Keimblattes noch nicht stattgefunden hat, obwohl sich die Embryonen im gleichen Stadium der Entwicklung befinden sollten. (Abb. 30 b, e und h, k).

Weiterhin scheint es Unterschiede in der Anzahl der Segmente zu geben. So können z. B. im Fall der Kontrollen neun opisthosomale Segmente (O9) gezählt werden, bei den *Fng* RNAi Embryonen hingegen nur sieben (O7) (Abb. 30 f, l). Dieses hat aber wohl mehr mit

einem, durch den *Fng* RNAi Effekt verursachten, Entwicklungsrückstand zu tun, als mit einem Abbruch des Segmentierungsprozesses. So variiert bei unterschiedlichen Injektionsansätzen die Differenz in der Anzahl der Segmente (vgl. Abb. 31 d, h) und auch die Trennung der beiden Hälften des Keimblattes findet statt (Abb. 31 c, g). Somit gibt es kein Anzeichen dafür, dass der Segmentierungsprozess der *Fng* RNAi Embryonen zu einem bestimmten Zeitpunkt oder Entwicklungsstadium stoppen würde.

Insgesamt ähneln die beschriebenen *Fng* RNAi Phenotypen denen von *Notch*, *Dl-1* und *Dl-2* (vgl. Ergebnisse 3.4.2). Die Effekte erscheinen allgemein etwas schwächer, vor allem die Deformationen der Segmente sind weniger dramatisch, was auch die Störungen des *engrailed* Musters schwächer erscheinen lässt. Dennoch scheint *Fng* für die Funktionen der Notch-Signalkaskade während der Formation von Segmenten und deren Grenzen notwendig zu sein.

### 3.6.3 *Fng* ist notwendig zur Organisation des *Delta-1* Musters

Im Folgenden sollte geklärt werden, ob *Fng* auch die Expression von *Dl-1* beeinflusst. Dazu wurden *Fng* RNAi Embryonen für *Dl-1* und DAPI gefärbt (Abb. 31).

Solche Embryonen weisen keine spezifische *Dl-1* Expression mehr auf. Das neurale Muster der anterioren Segmente ist nicht mehr zu beobachten, das Prosoma ist fast vollständig frei von Expression (Abb. 31 a, e). Ähnliches gilt für das Opisthosoma. Hier fehlt ebenfalls die spezifische segmentale Färbung und auch eine dynamische Expression in der Wachstumszone ist nicht mehr zu beobachten (Abb. 31g). In *Drosophila* ist *Fng* nicht an allen Funktionen der Notch-Signalkaskade beteiligt. So ist *Fng* zwar für die Formation von Grenzen, z. B. im Flügel notwendig, hat aber keine Funktion während der Neurogenese (Panin et al. 1997, Irvine 1999). In der Spinne ist *Fng* nun nicht nur an der Organisation des dynamischen *Dl-1* Musters beteiligt, sondern auch die Expression im Neuroektoderm benötigt *Fng*. Dieses lässt auf eine generellere Funktion von *Fng* für die Spinnen Notch-Signalkaskade schließen, als dies für *Drosophila* der Fall ist.

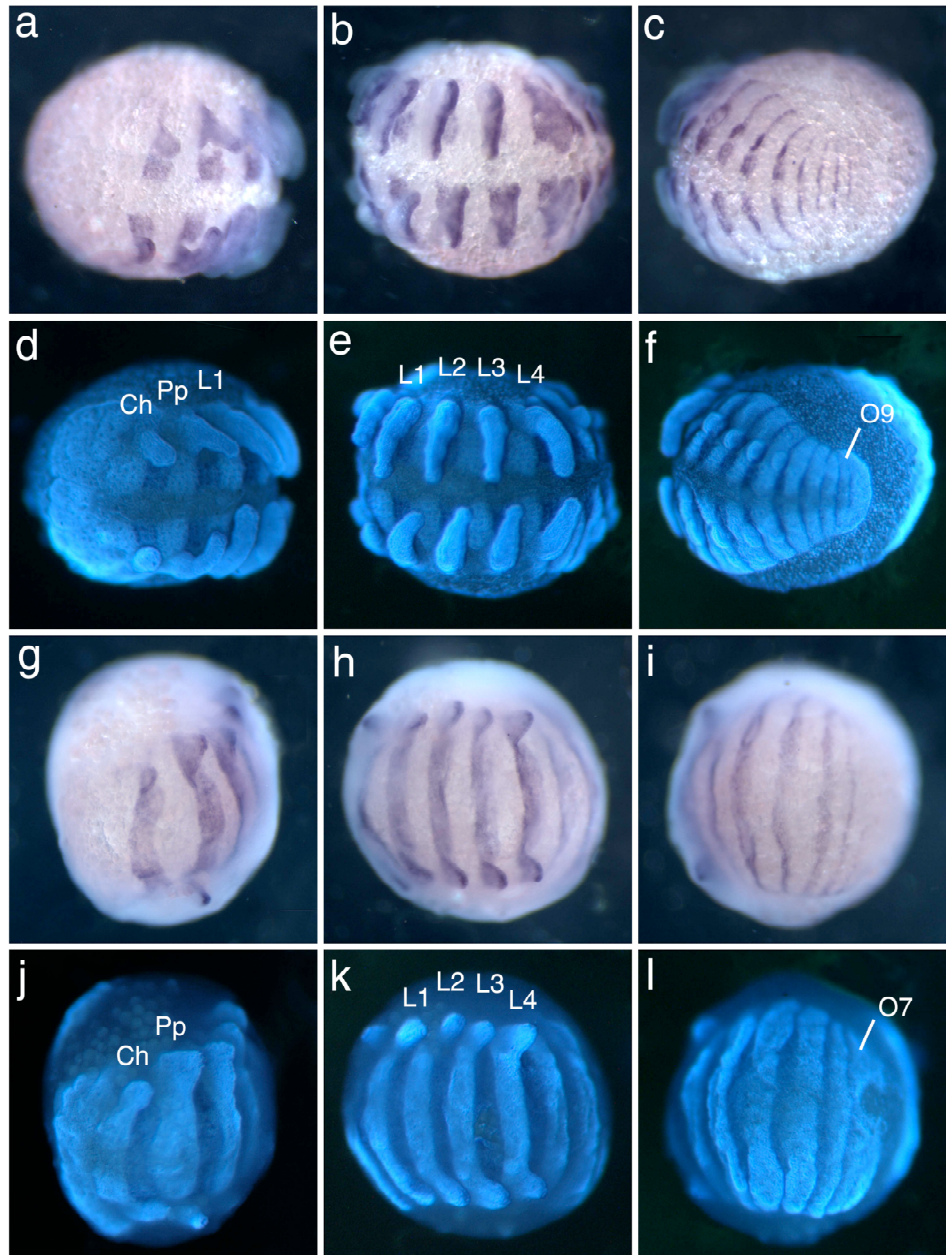
### Abbildung 30: *Fringe* RNAi führt zu Segmentierungsdefekten

**(a-f)** GFP dsRNA injizierter Kontrollembryo, **(g-l)** *Fringe* RNAi Embryo. Die Embryonen wurden für *engrailed* und zusätzlich für DAPI (d-f und j-l) gefärbt.

**(a-f)** Kontrollembryo aus unterschiedlichen Blickwinkeln. Die segmentale *engrailed* Expression des **(a, b)** Prosomas und des **(c)** Opisthosomas. **(d-f)** morphologische Effekte sind nicht zu beobachten.

**(g-l)** *Fringe* RNAi Embryo. Die Segmente des **(j-k)** Prosomas und des **(l)** Opisthosomas wirken deformiert und variieren in ihrer Größe und Breite. Die **(g-i)** Expression von *engrailed* erscheint nicht mehr regulär. Hierbei sind **(i)** vor allem die posterioren Expressionsgrenzen betroffen.

Der Unterschied in der Anzahl der Segmente zwischen der Kontrolle (f) und dem *Fringe* RNAi Embryo (l) resultiert wahrscheinlich aus einer verzögerten Entwicklung der RNAi Embryonen (vgl. Ergebnisse 3.6.2). Anterior ist in allen Fällen links. Ch: Cheliceren, Pp: Pedipalpen. L1-L4: Laufbeine, O: Segmente des Opisthosomas.



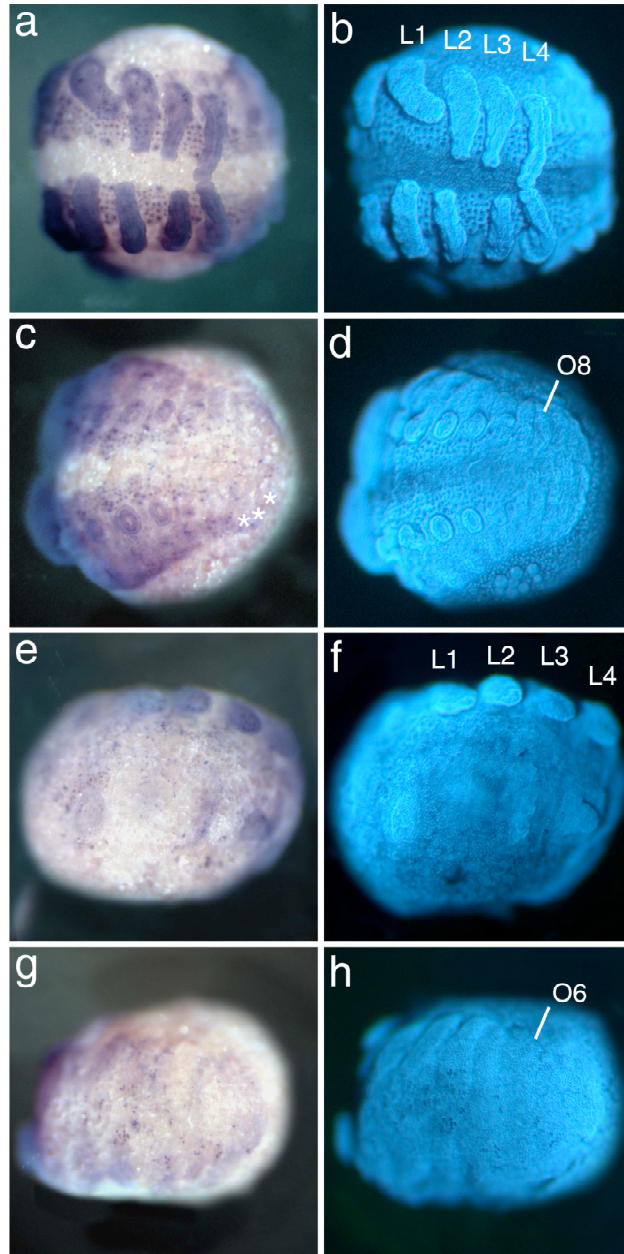
### Abbildung 31: Die Expression von *Dl-1* ist bei *Fng* RNAi Embryonen gestört

Dargestellt ist die Expression von *Dl-1* bei **(a-d)** mit GFP dsRNA injizierten Kontrollembryonen sowie **(e-h)** *Dl-1* RNAi Embryonen. Zusätzlich wurden die Embryonen (b, d, f, h) mit DAPI gefärbt.

**(a-d)** die mit GFP dsRNA injizierten Embryonen weisen **(b, d)** keine Segmentierungsdefekte auf. Die **(a)** neurale Expression und auch die **(c)** Expression von *Dl-1* in der Wachstumszone (Sterne) erscheinen normal für dieses Stadium der Entwicklung.

**(e-f)** neben den **(f, h)** Segmentierungsdefekten treten Störungen im *Dl-1* Expressionsmuster auf. So kann weder eine reguläre **(e)** neurale Expression, noch eine **(g)** organisierte dynamische *Dl-1* Expression beobachtet werden. **(f)** die Extremitäten sind reduziert, wobei in diesem Beispiel der Effekt auf einer Seite des Keimblattes stärker ist. Dieses ist auf Mosaikeffekte zurückzuführen. Anterior ist in allen Fällen links. L1-L4: Laufbeine, O: Segmente des Opisthosomas.





## 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte der Vergleich der molekularen Segmentierungsmechanismen von Vertebraten, *Drosophila* und der Spinne *Cupiennius salei* Einblicke in die Evolution der Segmentierung liefern. Hierbei stand neben den Funktionen der Gene während der Segmentierung auch die Analyse deren regulatorischer Interaktionen im Vordergrund.

### 4.1 Ist die Ebene der Paar-Regel Gene konserviert?

Bereits die Publikation der primären Paar-Regel Gen Homologe der Spinne (Damen et al. 2000) legte die Vermutung nahe, dass diese Gene am Segmentierungsprozess der Spinne beteiligt sein könnten. Doch konnte bislang nicht geklärt werden, ob auch ein doppelsegmentaler, zu *Drosophila* vergleichbarer, Mechanismus vorliegt. Zur Beantwortung dieser Frage war es notwendig, die Expression der Spinnen Paar-Regel Gen Homologe genauer zu untersuchen.

Die Analyse des *Cupiennius pby-3* Gens (Ergebnisse 3.1) erbrachte dabei zwei wichtige Punkte. Zum einem konnte gezeigt werden, dass die Segmente des Opisthosomas einzeln entstehen, also für diese Segmente scheinbar kein doppelsegmentaler Mechanismus vorliegt. Zum anderen konnte die genaue Abfolge der dynamischen Expressionsstadien in der Wachstumszone bestimmt werden, wobei deutlich wurde, dass ein Segment je dynamischen Zyklus entsteht. Kann damit also ein doppelsegmentaler Mechanismus während der Entwicklung der Spinne ausgeschlossen werden? Eine solche Aussage wäre wohl voreilig, da es auch für die Cheliceraten einen Hinweis auf einen Paar-Regel Mechanismus gibt (Dearden et al. 2002). Das *paired* Homolog der Milbe *Tetranychus urticae* (*Tu-pax3/7*) scheint zumindest im Prosoma in einem doppelsegmentalen Muster ausgeprägt zu werden. So kann beobachtet werden, dass die Expression von *Tu-pax3/7* in den Laufbeinsegmenten L1 und L3 im Vergleich zu den Pedipalpen, L2 und zu L4 verzögert auftritt. Dieses interpretieren die Autoren als mögliches Paar-Regel Muster. Allerdings tritt dieses Muster nur in den Segmenten des Prosomas auf. In den Segmenten des Opisthosomas hingegen erscheinen die *Tu-pax3/7* Expressionsdomänen einzeln, scheinbar segmental, was nicht auf einen doppelsegmentalen Mechanismus schließen lässt (Dearden et al. 2002). Dieses würde den Ergebnissen dieser Arbeit entsprechen und zudem auf unterschiedliche Mechanis-

men bei der Musterbildung von Prosoma und Opisthosoma der Cheliceraten schließen lassen. Es wäre also möglich, dass die Segmente des Prosomas über einen doppelsegmentalen Mechanismus gebildet werden, im Fall des Opisthosomas die Segmente aber einzeln entstehen. Um dieses bestätigen zu können, müsste die Expression der *Cupiennius* Paar-Regel Gen Homologe während der Entstehung der prosomalen Segmente untersucht werden. Dieses scheiterte jedoch bislang an technischen Schwierigkeiten. So ist es nicht möglich solche Stadien der Entwicklung zu fixieren, bei denen sich der Kopfbereich und die Segmente der Laufbeine bilden. Diverse Versuche das Fixierungsprotokoll zu modifizieren scheiterten, sodass keine Aussagen über die frühe Expression des *pby-3* Gens getroffen werden können. Allerdings gibt es verschiedene morphologische Studien zur frühen Spinnenentwicklung (Seitz 1966, Akiyama-Oda und Oda 2003). Diese zeigen, dass die Segmente des Prosomas ausgehend von einer Keimscheibe entstehen, die sich sowohl aus embryonalen als auch aus nicht-embryonalen Zellen zusammensetzt. Diese Zellen stammen aus der Peripherie des Eies, wo sie mehrer Teilungen durchlaufen und dann absinken, um die Keimscheibe zu bilden. Auch diese Studien liefern zwar keinen Aufschluss über die molekularen Mechanismen der Musterbildung im Prosoma, bestätigen jedoch, dass die Segmente des Opisthosomas einzeln gebildet werden (Akiyama-Oda und Oda 2003).

Somit kann festgehalten werden, dass bei Cheliceraten die Segmente des Opisthosomas einzeln gebildet werden, es hier also keinen doppelsegmentalen Mechanismus zu geben scheint. Aber es treten auch Zweifel über den angeblichen Paar-Regel Mechanismus bei der Milbe auf. So kann das beschriebene Muster nicht für das *Tetranychus urticae runt* Gen beobachtet werden (Dearden et al. 2002). Im Fall der Spinne jedoch ähneln sich die Expressionsmuster der verschiedenen Paar-Regel Gen Homologe (Damen et al. 2000, Ergebnisse 3.1). Ein weiterer unklarer Punkt bei der Milbe ist der Übergang vom primären in das sekundäre, segmentale Muster. Die segmentalen Paar-Regel Muster treten nicht immer in einer strikten anterioren zu posterioren Reihenfolge auf, wie dieses z. B. für das *Schistocerca pby-1* Gen beobachtet werden kann (Davis et al. 2001). So könnte das beobachtete doppelsegmentale Muster bei der Milbe auch auf eine verzögerte, segmentale Expression zurückzuführen sein. Bis also die Expression weiterer Cheliceraten Paar-Regel Gen Homologe während der Entwicklung des Prosomas nicht untersucht wurde, kann eine eindeutige Aussage über den Mechanismus nicht getroffen werden.

Mit der Beschreibung der oszillierenden Expression von *her-1* und *c-hairy* beim Zebrafisch und dem Huhn (Palmeirim et al. 1997, Holley et al. 2000) stellte sich die Frage, ob

nicht auch eine solche Oszillation der Grund für das dynamische Expressionsmuster der Spinnen Paar-Regel Gen Homologe sein könnte. Zudem konnte festgestellt werden, dass das *Cupiennius salei* *Delta-1* Gen in einem dynamischen Muster vergleichbar zu den Paar-Regel Gen Homologen ausgeprägt wird (Ergebnisse 3.4). Dieses könnte darauf hinweisen, dass die Paar-Regel Gen Homologe der Spinne und das *Delta-1* Gen vergleichbar reguliert werden, sich also der Mechanismus der Expression ähnelt.

Die oszillierende Expression bei den Vertebraten verläuft in Wellen über das PSM. Hierbei wird die Expression „ein- und ausgeschaltet“, jede Zelle im PSM prägt das Gen somit mehrfach aus (Palmeirim et al. 1997, Holley et al. 2000). Wie bereits in der Einleitung beschrieben, konnte eine oszillierende Expression auch für manche der Vertebraten *Delta* und *Fng* Gene beschrieben werden (zur Übersicht: Pourquoié 2001b, Saga und Takeda 2001). Der klassische Nachweis solch einer oszillierenden Expression verläuft über die Teilung von Embryonen (Palmeirim et al. 1997). Hierbei wird eine Hälfte des Embryos direkt fixiert, die andere entwickelt sich zunächst weiter und wird später fixiert. Die beiden Hälften werden anschließend für das zu untersuchende Gen gefärbt. Tritt eine „Verschiebung“ der Expression zwischen den beiden Hälften auf und ist diese nicht auf Zellteilungen oder Zellmigrationen zurückzuführen, kann von einer oszillierenden Expression ausgegangen werden. Der mögliche Einfluss durch Zellteilungen bzw. Migrationen kann durch geeignete Markierungen ausgeschlossen werden. Über solch einen Versuchsaufbau sollte auch die Expression der Spinnen Paar-Regel Gen Homologe untersucht werden. Ein solcher Ansatz ist allerdings technisch sehr anspruchsvoll und verlangt daher viele Embryonen. Zwar ist der Versuch im Prinzip durchführbar, doch standen nicht ausreichend viele Embryonen zur Verfügung, um genügend Daten erhalten zu können. Die häufig beschränkte Anzahl an Embryonen ist einer der Nachteile der Arbeit mit *Cupiennius salei*. Eine oszillierende Expression konnte somit bislang nicht auf direktem Wege nachgewiesen oder ausgeschlossen werden.

Die dynamische Expression der *Cupiennius salei* Paar-Regel Gen Homologe sowie die des *Delta-1* Gens könnte aber auch über andere Mechanismen erreicht werden. So wäre es möglich, dass die Expressionsdomänen durch Zellteilungen in anteriore Richtung „geschoben“ werden, und damit immer in denselben Zellen die Gene ausprägen würden.

Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden die Zellteilungsmuster in der Wachstumszone analysiert (Ergebnisse 3.1.3). Hierbei ergab sich, dass diese Muster nicht mit den Ex-

pressionsdomänen von *ppy-3* korrelierbar sind. Zudem konnten keine reproduzierbaren Domänen oder Muster beobachtet werden. Dieses bedeutet, dass die Dynamik der *ppy-3* Expression wohl nicht auf Zellteilungen und den damit verbundenen Bewegungen basiert. Allerdings besteht auch die Möglichkeit, dass die Domänen der dynamischen Expression ihre Position aufgrund interkalierender Zellen innerhalb der Wachstumszone verändern. Solche Bewegungen, auch als „convergent extension“ bekannt, treten während der Entwicklung von Invertebraten und Vertebraten unter anderem bei der Verlängerung der Körperachse auf (zur Übersicht: Wallingford et al. 2002, Keller 2002). So ist der Prozess der „convergent extension“ beispielsweise an der Entstehung und Verlängerung des PSMs der Vertebraten oder der Streckung des Keimbandes von *Drosophila* beteiligt (Pourquié 2001a, Keller 2002). Hierbei führt die Migration von Zellen dazu, dass das Gewebe entlang einer bestimmten Achse schmaler wird und sich somit diese Achse verlängert. Es wäre also möglich, dass bei der Spinne die Expression von *Dl-1* und den Paar-Regel Gen Homologen in den jeweiligen Zellen stabil bliebe und sich die Lage der Expressionsdomänen aufgrund von Zellbewegungen ändern würde.

Eine weitere Möglichkeit den Mechanismus der dynamischen Expression zu untersuchen, sind funktionelle Studien mittels RNAi. Doch wie bereits in den Ergebnissen (Ergebnisse 3.1.4) beschrieben, gelang es nicht Segmentierungsphentypen für die Paar-Regel Gen Homologe der Spinne zu erhalten, wie dieses auch für das *Krüppel-2* Gen der Fall war (Ergebnisse 3.3.5). Die Gründe hierfür können vielfältig sein. So besteht natürlich die Möglichkeit, dass diese Gene keine erkennbare Funktion während der Segmentierung von *Cupiennius salei* haben. Das würde aber bedeuten, dass sämtliche Paar-Regel Gen Homologe funktionslos wären, was eher unwahrscheinlich ist, da die Expressionsmuster dieser Gene auf Funktionen während der Segmentierung schließen lassen. Ein weiteres Problem besteht in der möglichen Redundanz von Genen. So existieren bei *Cupiennius* z. B. zwei *runt* Gene (Damen et al. 2000), was die Effektivität der RNA Interferenz beeinträchtigen könnte. Zudem kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass eine Redundanz bei der Funktion von Genen auftritt. Es wäre durchaus möglich, dass eine Reduktion, z. B. der *hairy* RNA, durch andere Paar-Regel Gen Homologe ausgeglichen werden kann. Allerdings haben auch Koinjektionen von dsRNA korrespondierend zu verschiedenen Paar-Regel Gen Homologen bislang keine Erfolge gezeigt.

Der eigentliche Grund für das Ausbleiben von Segmentierungsphentypen liegt wohl im RNAi Mechanismus selber. So ist bekannt, dass es einen Zusammenhang zwischen der

injizierten Menge an dsRNA und dem RNAi Effekt gibt (Kennerdell and Carthew 1998, Tuschl et al. 1999, Wargelius et al. 1999). Zudem „reagieren“ nicht alle Gene gleich auf die Injektion von dsRNA. Verschiedene Gene sind über den RNAi Ansatz nur schwer oder auch gar nicht beeinflussbar (Kennerdell and Carthew 1998). Das scheint daran zu liegen, dass bestimmte Gene auch nach der Reduktion eines Großteils der RNA ihre Funktion noch ausüben können. Dieses könnte auch der Fall bei den *Cupiennius* Paar-Regel Gen Homologen sein. Die Injektionen haben vielleicht nur zur einer teilweisen Reduktion der RNA geführt, wobei diese nicht ausgereicht hat, um einen RNAi Effekt zu verursachen. Das wird auch durch die Auswertung der *Kr-2* dsRNA injizierten Embryonen bestätigt. Hier zeigte sich eindeutig, dass es nicht gelungen war die *Kr-2* RNA vollständig zu reduzieren (Ergebnisse 3.3.5). Die verbleibende Menge könnte ausreichen die Funktion von *Kr-2* weiterhin aufrechtzuerhalten.

Allerdings konnten RNAi Phenotypen für ein anderes dynamisch ausgeprägtes Gen, das *Delta-1* Gen, beobachtet werden (Ergebnisse 3.4). Neben den morphologischen Phenotypen, die an anderer Stelle diskutiert werden sollen (Diskussion 4.3), war auch die Expression des *hairy* Gens in der Wachstumszone gestört. Einzelne Expressionsdomänen waren nicht mehr erkennbar und *hairy* positive Zellen über die gesamte Wachstumszone verteilt. Eine solche Desorganisation des *hairy* Musters trat nicht nur im Fall der *DI-1* RNAi Embryonen auf, auch die Inhibition von *DI-2* und *Notch*, welche nicht die Dynamik von *DI-1* und der Paar-Regel Gen Homologe aufweisen, erbrachte die beschriebene Störung der *hairy* Expression. Dieses zeigt, dass die Notch-Signalkaskade für die Organisation der *hairy* Expression notwendig ist. Im Fall der Vertebraten ist die Notch-Signalkaskade für die Aufrechterhaltung der oszillierenden Genexpression erforderlich (Pourquié 1999, Holley et al. 2000, 2002; Jouve et al. 2000, Jiang et al. 2000, Oates und Ho 2002, Dale et al. 2003). Auch hier treten Desorganisationen der oszillierenden *her/hes* Muster auf, wenn die Notch-Signalkaskade gestört wird. Die Phenotypen sind hierbei durchaus mit denen der Spinne vergleichbar. Wird z. B. die Expression der Zebrafisch Gene *her-1* und *her-7* in verschiedenen *Notch* oder *Delta* Mutanten untersucht, kann beobachtet werden, dass die einzelnen Expressionsdomänen aufgelöst erscheinen und *her-1* bzw. *her-7* positive Zellen über das PSM verteilt sind (Holley et al. 2000, Oates und Ho 2002). Es scheint somit, dass die Regulation der dynamischen *Cupiennius hairy* Expression und die der oszillierenden Vertebraten Gene in vergleichbarer Weise stattfindet. Dieses wird auch dadurch bestätigt, dass im Bereich des *Cupiennius hairy* Promotors eine potentielle *Su(H)* Bindestelle (SPS, Ergebnisse 3.2.1) beschrieben werden konnte. Über diese regulatorischen Elemente und da-

mit via *Su(H)* kann im Fall der Vertebraten die oszillierende Expression der *her/hes* Gene gesteuert werden (del Barco Barrantes et al. 1999, Gajewski und Voolstra 2002, Sieger et al. 2003). Zurzeit fehlt noch der funktionelle Nachweis, dass auch die *Cupiennius* SPS an der Regulation der *hairy* Expression beteiligt ist, doch lässt die Ähnlichkeit zu den *Drosophila* und Vertebraten SPS Sequenzen eine Funktion für das Element auch in *Cupiennius* vermuten.

Die Regulation der dynamischen *hairy* Expression mag zwar zwischen der Spinne und den Vertebraten vergleichbar sein, doch gibt es einen wichtigen Unterschied. Bei den Vertebraten konnte eine oszillierende Expression bisher für verschiedene *her/hes* Gene, manche *Delta* und *Fringe* Homologe sowie für *Axin* nachgewiesen werden (Pourquié 2001b, Saga und Takeda 2001, Aulehla et al. 2003). Im Falle der Spinne ist die Dynamik nicht auf *Dl-1* und *hairy* beschränkt. Vielmehr weisen auch die übrigen Paar-Regel Gen Homologe der Spinne eine solche Dynamik auf (Ergebnisse 3.1, Damen et al. 2000). Es stellt sich somit die Frage, ob auch andere *Cupiennius* Paar-Regel Gen Homologe über die Notch-Signalkaskade reguliert werden. Für das *eve* Gen konnte dieses ausgeschlossen werden (Ergebnisse 3.4.3). Die dynamische Expression von *eve* bleibt auch in *Notch* oder *Dl-1* RNAi Embryonen erhalten, was darauf schließen lässt, dass es einen weiteren Mechanismus gibt, der die Expression von *eve* und möglicherweise auch weiterer Paar-Regel Gen Homologe reguliert. Ob solch ein Mechanismus auf der *Drosophila* Segmentierungsgen-kaskade basiert ist nicht klar, doch wäre es durchaus möglich, dass die Gap Gene an solch einem Mechanismus beteiligt sind, da diese die Paar-Regel Gene in *Drosophila* regulieren (Ingham 1988, St. Johnston und Nüsslein-Volhard 1992). Jedoch ist es zurzeit noch unklar, ob ein klassischer Gap Gen Mechanismus auch für die Spinne existiert (vgl. Diskussion 4.2).

Aber nicht nur bei der Spinne gibt es Hinweise auf zwei parallel agierende Mechanismen. So führt die Deletion des *her-1* und *her-7* Gens im Zebrafisch zu vergrößerten Somiten, die aber noch häufig über schwächere Grenzen unterteilt werden (Henry et al. 2002). Hierbei fällt auf, dass starke und schwache Grenzen zu alternieren scheinen. Ähnliches ist auch bei der *Tribolium* Paar-Regel Mutante *Itchy* zu beobachten (Maderspacher et al. 1998). Hier alternieren starke und schwache *engrailed* Expressionsdomänen. Im Falle des Zebrafisches konnte noch nicht bestimmt werden, ob auch alternierende Somiten betroffen sind, doch besteht die Möglichkeit, dass neben der Oszillation von Genen auch eine Art von Paar-Regel Mechanismus an der Somitogenese beteiligt sein könnte (Henry et al. 2002).

Doch aus welchem Grund sollten bei der Spinne verschiedene Paar-Regel Gen Homologe über unterschiedliche Mechanismen reguliert werden? Eine Möglichkeit wäre, dass sich die Musterbildung im Ektoderm von der im Mesoderm unterscheidet. Im Falle der Vertebraten sind die Somiten mesodermale Strukturen, bei *Drosophila* hingegen wird über die Segmentierungskaskade das Ektoderm segmentiert. Ob nun bei *Cupiennius* unterschiedliche Mechanismen an der Musterbildung von Mesoderm und Ektoderm beteiligt sind, kann zurzeit nicht beantwortet werden, da über die Entwicklung des Mesoderms noch nicht viel bekannt ist und auch geeignete molekulare Marker noch fehlen (Anderson 1973, Damen nicht veröffentlicht). Alternativ könnten beide Mechanismen parallel an der Formation der Segmente beteiligt sein. Auch ist es denkbar, dass über die Paar-Regel Gen Homologe, die nicht via *Notch* reguliert werden, die Anzahl der zu bildenden Segmente bestimmt wird. Einen Hinweis darauf liefern die RNAi Phentypen für *Notch*, *Dl-1* und *Dl-2* (Ergebnisse 3.4.2). Hier treten zwar Segmentierungsdefekte auf, jedoch keine Variationen in der Anzahl der Segmente. Allerdings können solche Variationen im Fall der *Su(H)* RNAi Phentypen beobachtet werden (Ergebnisse 3.5.2 und Diskussion 4.3).

Zur Regulation der *eve* Expression liegen keine weiteren Daten vor. Somit kann auch nicht mit Sicherheit angenommen werden, dass wirklich zwei vollständig unabhängige Mechanismen an der Spinnensegmentierung beteiligt sind. Weitere Analysen müssen folgen, um diese Hypothese bestätigen zu können.

Dass der aus *Drosophila* bekannte Paar-Regel Mechanismus auch in der Spinne *Cupiennius salei* existiert, ist eher unwahrscheinlich. Zumindest für das Opisthosoma kann ein doppelsegmentaler Mechanismus wohl ausgeschlossen werden. Die Segmente entstehen hier einzeln, wobei mit einem Zyklus der dynamischen Expression auch ein Segment gebildet wird. Die Natur dieser dynamischen Expression konnte bislang nicht bestimmt werden. Die Tatsache, dass das *hairy* Gen über die Notch-Signalkaskade reguliert wird, lässt auf einen Mechanismus schließen, der dem der Vertebraten vergleichbar sein könnte. Allerdings gibt es auch Hinweise darauf, dass eine *Notch* unabhängige Regulation der Spinnen Paar-Regel Gen Homologe existiert.



## 4.2 Ist die Ebene der Gap Gene konserviert?

Um die Frage nach einem möglichen Gap Gen Mechanismus bei der Spinne zu beantworten, wurden die *Krüppel* Homologe *Kr-1* und *Kr-2* analysiert (Ergebnisse 3.3). Hierbei standen nicht nur potentielle Segmentierungsfunktionen der Gene im Vordergrund, sondern auch mögliche regulatorische Interaktionen mit den Paar-Regel Gen Homologen. Es geht also auch um die Frage, ob die Gap Gene die Paar-Regel Gene regulieren können und somit, neben den Segment-Polaritäts Genen, weitere Ebenen der *Drosophila* Segmentierungskaskade bei der Spinne konserviert sind.

Die Expression von *Kr-1* in einer Domäne innerhalb der Wachstumszone der Spinne ließ zunächst vermuten, dass eine Gap Domäne vorliegen könnte (Ergebnisse 3.3.1), da auch das *Tribolium Krüppel* (*Tc-Kr*) Gen zu Beginn der Entwicklung in einer posterioren Domäne ausgeprägt wird (Sommer und Tautz 1993). Mit der Entstehung neuer Segmente gelangt die *Tc-Kr* Domäne dann in eine zentrale Position. *Tc-Kr* scheint somit, vergleichbar zum *Drosophila Krüppel* Gen, an der Formation der Segmente des Thorax und der anterioren abdominalen Segmente beteiligt zu sein. Die Unterschiede zwischen *Drosophila* und *Tribolium* in der frühen Expression ergeben sich aus der Kurzkeimentwicklung von *Tribolium* (Sommer und Tautz 1993). Im Gegensatz zu *Tribolium* bleibt die *Cupiennius Kr-1* Expression aber auch mit der Entstehung neuer Segmente in der Wachstumszone stabil. Zwar wird die Domäne im Verlauf der Entwicklung auf einen schmalen, posterior in der Wachstumszone liegenden Bereich reduziert, doch entspricht eine solche Expression wohl nicht einem Gap Gen Muster. Auch die Expressionsdomänen der *Tribolium* und *Schistocerca hb* Gene verschieben sich mit der Entstehung neuer Segmente (Wolff et al. 1995, Patel et al. 2001). So wird das *Schistocerca hb* Gen im so genannten „Herz-Stadium“ in einer posterioren Domäne ausgeprägt, die mit der Addition von Segmenten in eine anteriore Position gelangt. Hierbei bleibt die einmal begonnene Expression in den Zellen erhalten, die Verschiebung der Domäne geschieht aufgrund der Entstehung neuer Segmente (Patel et al. 2001).

Das *Cupiennius Kr-1* Gen scheint also nicht in einer Gap Domäne ausgeprägt zu werden, was vermuten lässt, dass auch keine Gap Gen Funktion vorliegt. Dieses wird durch die funktionelle Analyse von *Kr-1* bestätigt (Ergebnisse 3.3.2). Die *Kr-1* RNAi Embryonen entwickeln sich bis zur Bildung des vierten bzw. fünften opisthosomalen Segmentes normal, danach stoppt der Segmentierungsprozess und wird auch nicht wieder aufgenommen.

Das zeigt, dass *Kr-I* zwar eine Funktion während der Segmentierung der Spinne hat, doch würde man im Fall einer klassischen Gap Gen Funktion andere Effekte erwarten. So führen Mutationen der Gap Gene in *Drosophila* zur Deletion breiter Bereiche des Embryos. Die Segmente, die anterior bzw. posterior dieser Deletionen liegen, werden aber nahezu normal angelegt (Nüsslein-Volhard und Wieschaus 1980). Auch funktionelle Studien in *Tribolium* erbrachten vergleichbare Phänotypen (Schröder 2003). Zudem liegen hier Mutanten vor, die den klassischen Gap Gen Phänotyp aufweisen (Maderspacher et al. 1998). Allerdings kann für die Spinne auch nicht ausgeschlossen werden, dass *Kr-I* für die Bildung aller Segmente ab O4/O5 notwendig ist.

Die Funktion als Gap Gen beinhaltet aber nicht nur den Phänotyp, sondern auch eine definierte Rolle bei der Regulation anderer Segmentierungsgene. So agiert *Krüppel* während der Entwicklung von *Drosophila* meist als Repressor für andere Gap und Paar-Regel Gene wie z. B. für *hairy* (Ingham 1988, Pankratz und Jäckle 1993). Das bedeutet auch, dass sich die Expressionsmuster dieser Gene ändern, sobald *Krüppel* nicht mehr vorhanden ist. Solche Interaktionen im Fall der *Cupiennius Kr-I* RNAi Embryonen zu untersuchen, gestaltete sich als schwierig, da bei diesen Embryonen die Wachstumszonen wie aufgelöst erschienen und somit keine Zellen mehr vorhanden waren, die Gene hätten ausprägen können. Somit wurde die Expression von *hairy* bei schwächeren RNAi Phänotypen untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass die dynamische Expression von *hairy* nicht verändert war (Ergebnisse 3.3.3). Dieses könnte bedeuten, dass *hairy* nicht via *Kr-I* reguliert wird, was wiederum die These unterstützen würde, dass die dynamische *hairy* Expression über die Notch-Signalkaskade organisiert wird (Diskussion 4.1). Allerdings muss hierbei beachtet werden, dass bei den schwächeren RNAi Phänotypen die Menge an *Kr-I* RNA noch ausreichen könnte, um die Expression von *hairy* zu regulieren. Die Analyse von Expressionsmustern bei schwachen Phänotypen kann also keinen endgültigen Aufschluss über die regulatorischen Interaktionen verschiedener Gene geben.

Aber auch das Auftreten von graduellen Effekten kann als Argument gegen einen Gap Gen Phänotyp gesehen werden. Zwar bilden sich hier weitere Segmente und auch die Wachstumszone scheint über mehr Zellen zu verfügen, doch wird auch hier in keinem Fall der normale Segmentierungsprozess wieder aufgenommen. Schwächere Phänotypen konnten z. B. auch im Fall von *Tribolium hb* RNAi Experimenten beobachtet werden (Schröder 2003). Hier traten zwar Unterschiede in der Anzahl an deletierten Segmenten auf, doch wurde auch hier der Segmentierungsprozess wieder aufgenommen.

Das Expressionsmuster sowie der RNAi Phenotyp legen also die Vermutung nahe, dass *Kr-1* nicht als Gap Gen im klassischen Sinne agiert. Dennoch hat *Kr-1* eine Funktion während des Segmentierungsprozesses der Spinne. Doch worin könnte diese Funktion bestehen? Betrachtet man die RNAi Phentypen, so scheint es eine direkte Korrelation zwischen dem Abbruch der Segmentierung und den Defekten der Wachstumszone zu geben (Ergebnisse 3.3.3). Diese scheinen sich von posterior her aufzulösen, wodurch dann nicht mehr genügend Zellen für die Formation von Segmenten zur Verfügung stehen. Im Fall der schwächeren RNAi Phentypen sind die Zellen der Wachstumszone vielleicht weniger stark betroffen oder der Effekt auf die Zellen tritt später ein. Dadurch könnten weitere Segmente entstehen bevor der Segmentierungsprozess zum Erliegen kommt. Das würde allerdings Bedeuten, dass *Kr-1* hier, direkt oder indirekt, als Überlebens- oder Proliferationssignal dient. Eine solche Funktion wurde auch für das *Drosophila Krüppel* Gen beschrieben (Gaul und Weigel 1991, Romani et al. 1996). So wurde deutlich, dass in *Drosophila* Mutationen von *Krüppel* auch zu Zelltod, Fehlspezifikationen und anormaler Migration von Zellen führen. Dieses betrifft primär Gliazellen, die Malpighi-Gefäße und den Fettkörper von *Drosophila*. Somit ist es gut möglich, dass im Fall der Spinne die Zellen der Wachstumszone auf *Kr-1* als Überlebens- oder Proliferationssignal angewiesen sind. Gegen solch eine mehr allgemeine Funktion von *Kr-1* während der Entwicklung spricht allerdings, dass eine starke Reduktion der *Kr-1* Expression in der Wachstumszone stattfindet (Ergebnisse 3.3.1). Zwar reduziert sich auch die Größe der Wachstumszone, doch nicht im gleichen Maße wie die *Kr-1* Expressionsdomäne. Zudem ist unklar, warum *Kr-1* erst ab den Segmenten O4/O5 notwendig ist und sich die anterior liegenden Segmente normal entwickeln. Es wäre natürlich möglich, dass die *Kr-1* Funktionen nur zu bestimmten Zeitpunkten der Entwicklung benötigt werden. Um dies klären zu können, müssen weitere Untersuchungen folgen.

Neben dem *Kr-1* Gen verfügt die Spinne über ein zweites *Krüppel* Homolog (*Kr-2*). Ob diese *Kr-2* Gen jedoch eine Rolle beim Segmentierungsprozess der Spinne spielt, kann zurzeit nicht abschließend beantwortet werden. Die Expression von *Kr-2* ist in jungen Stadien auf den Bereich zwischen dem dritten Laufbeinsegment (L3) und der Wachstumszone beschränkt. Im Falle einer Segmentierungsfunktion wäre eine Expression in der Wachstumszone zu erwarten, dieses ist aber in keinem der zugänglichen Stadien der Fall. Aber hier liegt auch das Problem bei der Auswertung der Gap Gen Homologe. Wie bereits dis-

kutiert (Diskussion 4.1), sind nicht alle frühen Stadien der Entwicklung zugänglich, sodass eine frühere Expression von *Kr-2* und auch *Kr-1* nicht ausgeschlossen werden kann. Zudem erbrachten die *Kr-2* RNAi Ansätze keine Segmentierungsphenotypen (vgl. Diskussion 4.1).

Ausgehend von den vorhandenen Daten zu *Kr-2* erscheint eine Beteiligung am Segmentierungsprozess der Spinne eher unwahrscheinlich. Vielmehr lässt die *Kr-2* Expression auf eine neurale Funktion schließen, zumal die zunächst flächig wirkende Expressionsdomäne in ein neurales Muster übergeht. Auch *Kr-1* weist eine neurale Expression auf, wie dies auch in *Drosophila* und anderen Insekten der Fall ist (Ingham 1988, Rohr et al. 1999). Somit scheinen die neuronalen Funktionen der *Krüppel* Gene konserviert zu sein.

Eine konservierte Funktion während der Neurogenese wird auch dem *hb* Gen zugesprochen (Iwasa et al. 2000, Werbrock et al. 2001). Dieses ist bislang das einzige Gap Gen Homolog, das außerhalb der Arthropoden analysiert wurde. Allerdings ergaben sich weder für Polychaeten noch für die Blutegel eine Segmentierungsfunktion (Iwasa et al. 2000, Werbrock et al. 2001). Dieses zeigt, dass eine neurale Funktion der Gap Gen Homologe nicht auf die Arthropoden beschränkt ist, wie auch durch die Analyse eines Nematoden *hb* Homologs bestätigt wird (Fay et al. 1999). Somit scheint die neurale Funktion der Gap Gen evolutionär wesentlich älter als die Segmentierungsfunktion zu sein.

Die vorliegenden Daten zu den Gap Genen der Spinne legen die Vermutung nahe, dass die Segmentierungsfunktionen sowie die regulatorischen Interaktionen nicht konserviert sind. Nur für *Kr-1* konnte eine Beteiligung an der Segmentierung der Spinne nachgewiesen werden, wobei diese wohl nicht auf eine Funktion als Gap Gen zurückzuführen ist. Allerdings müssen weitere Untersuchungen, vor allem sehr junger Stadien, folgen, um endgültige Aussagen treffen zu können.

### 4.3 Die Notch-Signalkaskade ist am Segmentierungsprozess der Spinne beteiligt

Die Notch-Signalkaskade dient der Zell-Zell Kommunikation, ist hoch konserviert und während der Entwicklung multizellulärer Organismen an diversen Prozessen beteiligt. (zur Übersicht: Artavanis-Tsakonas et al. 1999, Baron et al. 2002). Hierbei steht zumeist die Regulation von Zellschicksalen im Vordergrund, wobei ausgehend von äquivalenten aber auch nichtäquivalenten Zellen Unterschiede etabliert werden. Diese resultieren bei *Drosophila* z. B. in der Formation der dorso-ventralen Grenze im Flügel, der Spezifikation bestimmter Photorezeptorzellen oder der Etablierung neuraler Zellschicksale (Artavanis-Tsakonas et al. 1999). Zudem spielt die Notch-Signalkaskade eine wichtige Rolle bei der Segmentierung der Beine (Rauskolb und Irvine 1999), ist allerdings, im Gegensatz zu den Vertebraten, nicht an der Körpersegmentierung von *Drosophila* beteiligt (Davis und Patel 1999). Hier besteht also ein fundamentaler Unterschied zwischen den Segmentierungsprozessen von *Drosophila* und der Vertebraten.

Es stellte sich nun die Frage inwieweit die Notch-Signalkaskade an der Segmentierung der Spinne beteiligt sein könnte. Der Vergleich mit den Segmentierungsmechanismen der Vertebraten war notwendig geworden, da immer deutlicher wurde, dass nicht alle Ebenen der *Drosophila* Segmentierungsgenkaskade auch für die Spinne konserviert sind (Damen et al. 2000, Damen 2002a, Diskussion 4.1 und 4.2).

Die Auswertung der *Notch*, *Delta-1* und *Delta-2* Expressionsmuster und der RNAi Phänotypen zeigt eindeutig, dass die Notch-Signalkaskade nicht nur an der Etablierung der Segmente beteiligt ist, sondern auch an der Organisation der dynamischen *hairy* Expression (Ergebnisse 3.4). Die Expressionsmuster von *Notch* und *Dl-2* unterscheiden sich dabei von dem von *Dl-1*. Während *Dl-1* eine Dynamik aufweist, die den Mustern der Paar-Regel Gen Homologen gleicht (Diskussion 4.1), werden *Notch* und *Dl-2* in zwei Domänen innerhalb der Wachstumszone ausgeprägt. Solche Unterschiede in der Expression können auch bei den Vertebraten beobachtet werden. So scheint das Zebrafisch *DeltaC* Gen im Gegensatz zu *DeltaD* und *Notch1* zu oszillieren (Holley et al. 2000, 2002). Im Fall der Maus, des Huhns und des Krallenfroschs konnte aber bislang weder für verschiedene *Notch* noch *Delta* Homologe eine oszillierende Expression beobachtet werden (Pourquié 1999, 2001a, Saga und Takeda 2001). Diese Gene, wie z. B. das *Delta-like 1* (*Dll-1*) Gen der Maus, werden in zwei Domänen innerhalb des PSMs ausgeprägt. Hierbei kann eine posteriore Domäne beobachtet werden, die über Bereiche frei von *Dll-1* Expression von der anterior

liegenden Domäne getrennt wird. Diese anteriore Domäne entspricht dem zukünftigen caudalen Bereich des entstehenden Somits. Das Expressionsmuster von *Dll-1* wird hierbei wahrscheinlich durch die Inhibition der Notch-Signalkaskade im zukünftigen rostralen Bereich etabliert. Mit der Entstehung neuer Somiten bleibt die *Dll-1* Expression in den Somiten stabil (Pourquié 2001a, Saga und Takea 2001). Eine solche Expression ähnelt den Mustern der *Cupiennius* *Dl-2* und *Notch* Gene. Auch hier sind verschiedene Domänen erkennbar, allerdings kann zurzeit noch nicht bestimmt werden, ob die Trennung dieser Domänen aufgrund der Inhibition der Expression geschieht.

Obwohl die Expressionsmuster der Gene der Notch-Signalkaskade bei den Vertebraten nicht einheitlich sind, ähneln sich doch die verschiedenen Phenotypen. So resultieren Mutationen von *Notch* oder *Delta* Genen in deformierten Somiten. Diese variieren in ihrer Größe, Breite und Form. Die anterior-posterior Polarität ist gestört und die Somitengrenzen bilden sich nur fehlerhaft oder werden nicht angelegt (Conlon et al. 1995, Hrabe de Angelis et al. 1997, Jen et al. 1997, del Barco Barrantes et al. 1999, Holley et al. 2000, 2002). Zudem findet keine organisierte Expression der oszillierenden Gene mehr statt. Vergleichbare Phenotypen treten auch auf, wenn mittels RNAi die *Cupiennius* Gene *Notch*, *Dl-1* und *Dl-2* inhibiert werden. Hier bilden sich die Segmente nicht mehr normal, sie variieren in ihrer Größe und Form. Auch die Segmentgrenzen bilden sich nicht mehr regulär und sind deformiert (Ergebnisse 3.4.2). Somit scheint die Notch-Signalkaskade bei Vertebraten und der Spinne an der Etablierung der Segmente sowie der Formation der segmentalen Grenzen beteiligt zu sein. Dass auch im Fall der Spinne die dynamische *hairy* Expression von der Notch-Signalkaskade abhängt, wurde bereits diskutiert (Diskussion 4.1).

Man könnte nun annehmen, dass sich die scheinbar getrennten Funktionen bei der Bildung der Segmente und der Etablierung der dynamischen Muster in der unterschiedlichen Expression der Gene widerspiegelt. So wäre es möglich, dass bei der Spinne *Dl-1*, welches dynamisch ausgeprägt wird, für die Organisation der *hairy* Expression zuständig ist, die Funktion von *Dl-2* hingegen könnte bei der Formation der Segmente liegen. Dieses scheint aber nicht der Fall zu sein, da die RNAi Phenotypen aller drei Gene identisch sind. Eine solche Unterscheidung ist aber auch bei Vertebraten nicht möglich. Mutationen der Zebrafisch Gene *DeltaC* und *DeltaD* führen zu identischen Phenotypen, obwohl sich die Expressionsmuster unterscheiden (Holley et al 2000, 2002, Oates und Ho 2002). Somit kann die Frage, warum bei der Spinne identische RNAi Phenotypen auftreten, obwohl die Expressionsmuster verschieden sind, zurzeit noch nicht beantwortet werden. Hier müssen weitere Analysen der *Notch*, *Dl-1* und *Dl-2* RNAi Phenotypen erfolgen.

Wie bereits in der Einleitung beschrieben (Einleitung 1.3), spielt das *Su(H)* Gen eine wichtige Rolle bei der Übertragung des Notch-Signals. In der Maus und im Zebrafisch wird *Su(H)* bzw. das Maus Homolog *RBP-Jk* ubiquitär ausgeprägt, wie dieses auch der Fall bei der Spinne ist (Oka et al. 1995, Sieger et al. 2003, Ergebnisse 3.5). Mutationen oder die Inhibition der *Su(H)* Funktion führen zu schweren Segmentierungsdefekten (Oka et al. 1995, Sieger et al. 2003). Hierbei treten stark verkürzte Embryonen auf, wobei sich nur noch die ersten Somiten bilden. Diese weisen eine gestörte Polarität, Deformationen und unregelmäßige Grenzen auf. Nach der Bildung der anterioren Somiten scheint die Entwicklung zu stoppen, da kein weiteres Gewebe vorhanden ist, von welchem aus die Somitogenese vonstatten gehen könnte. Neben diesem Entwicklungsstopp, der auch als letaler Phänotyp interpretiert wird, treten bereits zu früheren Zeitpunkten Verzögerungen in der Entwicklung auf.

Der Vergleich mit den *Su(H)* RNAi Phänotypen der Spinne macht deutlich, dass ähnliche Effekte auftreten (Ergebnisse 3.5.2). Hier stoppt die Segmentierung nach der Formation der ersten drei opisthosomalen Segmente. Diese erscheinen stark reduziert, wobei das Fehlen der *engrailed* Expression auf eine gestörte Polarität schließen lässt. Zudem wirken die Wachstumszonen der RNAi Embryonen ausgedünnt, über einen größeren Bereich verteilt. Wie auch im Fall der Vertebraten scheinen hier nicht genügend Zellen vorzuliegen, um weitere Segmente bilden zu können. Somit treten, vergleichbar zu *Notch* und *Delta*, bei Vertebraten und der Spinne ähnliche *Su(H)* Phänotypen auf.

Die Ausgangsfrage bei der Analyse des Spinnen *Su(H)* Gens war allerdings, ob die Übertragung des Notch-Signals via *Su(H)* verläuft oder ob *Su(H)* unabhängige Wege genutzt werden. Eine Möglichkeit diese Alternativen zu unterscheiden, liefert ein Vergleich der RNAi Phänotypen. Falls bei den *Su(H)* RNAi Embryonen schwächere Effekte oder nur Teilaspekte der *Notch* und *Delta* Phänotypen auftreten würden, wäre dieses ein Hinweis auf *Su(H)* unabhängige Mechanismen. Vergleicht man nun die RNAi Phänotypen der *Cupiennius* *Notch*, *Dl-1*, *Dl-2* und *Su(H)* Gene, treten zwar Gemeinsamkeiten auf, doch erscheint der *Su(H)* Phänotyp wesentlich stärker, da nicht nur die *engrailed* Expression fehlt, sondern auch der Abbruch des Segmentierungsprozesses zu beobachten ist. Hierfür gibt es verschiedene Interpretationen. So könnte der *Su(H)* Phänotyp einem vollständigen *Notch* Phänotyp entsprechen. In diesem Fall wären die beschriebenen Effekte für *Notch*, *Dl-1* und *Dl-2* nicht vollständig. Solche Mosaik-Effekte können bei der Spinne zwar auftreten (Schoppmeier und Damen 2001), doch konnte kein *Notch*, *Dl-1* oder *Dl-2* Embryo be-

obachtet werden, bei welchem die Anzahl der Segmente variierte, was gegen Mosaik-Phenotypen sprechen würde. Jedoch könnte auch eine Redundanz z. B. der *Delta* Gene vorliegen. Falls also die *Dl-1* Funktion mittels RNAi inhibiert wird, könnte *Dl-2* diesen Effekt eventuell partiell kompensieren. Somit träte auch kein vollständiger Defekt auf. Sieger et al. (2003) interpretieren den Zebrafisch *Su(H)* Phenotyp als vollständigen *Notch* Phenotyp. Hierbei gilt es allerdings zu beachten, dass es Hinweise auf getrennte Mechanismen für die Bildung anteriorer und posteriorer Somiten gibt, da bei Mutationen von *Notch* oder *Delta* die ersten Somiten noch gebildet werden können, bevor der Segmentierungsprozess zum Erliegen kommt (Sieger et al. 2003). Der *Notch* RNAi Effekt im Fall der Spinne betrifft jedoch alle Segmente, sodass von einer allgemeinen Segmentierungsfunktion ausgegangen werden kann, also auch die Segmente *Notch* und *Delta* benötigen würden, die bei *Su(H)* RNAi Embryonen nicht mehr gebildet werden. Es ist somit wahrscheinlicher, dass der *Su(H)* RNAi Effekt, wie auch in der Maus (Oka et al. 1995), letal ist, was zu dem beschriebenen Abbruch der Segmentierung führen würde und auch den Phenotyp der Wachstumszonen erklären könnte. Zudem hat *Su(H)* weitere Funktionen während der Embryonalentwicklung, die z. B. im Falle von *Drosophila* auch *Notch* unabhängig sein können (Artavanis-Tsakonas et al. 1999, Baron et al. 2002, Koelzer und Klein 2003). Somit könnte eine Kombination aus auftretender Redundanz von Teilen der Notch-Signalkaskade mit Effekten, die aus weiteren Funktionen von *Su(H)* resultieren zu den beobachteten Phenotypen führen. Das würde bedeuten, dass die Notch-Signalkaskade während des Segmentierungsprozesses der Spinne über *Su(H)* agiert und somit *Su(H)* unabhängige Wege nur eine untergeordnete Rolle spielen würden. Dieses beweist allerdings nicht, dass es keine weiteren Signalwege gibt, die die Notch-Signalkaskade beeinflussen. So zeigt eine aktuelle Studie aus der Maus, dass die Wnt-Signalkaskade das Notch-Signal regulieren kann (Aulehla et al. 2003). Die Autoren stellen ein Modell auf, wonach die Bindung der NICD an das Protein *Dishevelled* durch *Axin2* vermittelt wird. Hierdurch könnte das Notch-Signal inhibiert werden. Ob es einen solchen Mechanismus auch im Fall der Spinne gibt, werden weitere Untersuchungen klären müssen.

Wie bereits zuvor beschrieben, können die Funktionen der Notch-Signalkaskade bei der Etablierung der Segmente und der Organisation der dynamischen Expressionsmuster nicht unterschieden werden. Ist *Su(H)* vielleicht nur an der Segmentierung, aber nicht an der Organisation der dynamischen Expression beteiligt? Die Analyse der dynamischen *Dl-1* Expression bei *Su(H)* RNAi Embryonen ergab jedoch, dass auch dieses Muster gestört war (Ergebnisse 3.5.3). Da vergleichbare Effekte auch beim Zebrafisch und bei der Maus auf-



treten (del Barco Barrantes et al. 1999, Sieger et al. 2003), kann dieses als Hinweis darauf gewertet werden, dass *Su(H)* für alle Aspekten der Notch-Signalkaskade während des Segmentierungsprozesses der Vertebraten und auch der Spinne benötigt wird.

Das Notch-Signal scheint also über *Su(H)* vermittelt zu werden. Jedoch kann dieses Signal auch an anderer Stelle beeinflusst werden, um so eventuell unterschiedliche Funktionen der Notch-Signalkaskade zu etablieren. So führen Modifikationen des Notch Proteins via Fng bei *Drosophila* zur Modulation des Signals (Brückner et al. 2000, Moloney et al. 2000). Dieses hat zur Folge, dass das Delta vermittelte Signal gegenüber dem Serrate Signal verstärkt wird (Blair 1997, Panin et al. 1997, Irvine 1999). So kann die Aktivität von Notch über Fng positioniert werden. Über einen solchen Mechanismus werden während der Entwicklung von *Drosophila* verschiedenartige Grenzen gebildet (Irvine 1999). Diese Funktion von *Fng* scheint konserviert zu sein, da verschiedene *Fng* Gene auch eine wichtige Rolle bei der Somitogenese der Vertebraten spielen (Johnston et al. 1997). So führen Mutationen im Maus *lunatic fringe* (*lfng*) Gen zu Defekten bei der Somitogenese. Die Somiten variieren in ihrer Größe und Form, die Polarität scheint gestört und die Grenzen der Somiten bilden sich nicht mehr normal (Evrard et al. 1998, Zhang und Gridley 1998). Die Funktion von *lfng* scheint hier in der periodischen Repression von *Notch* und somit in der Positionierung der *Notch* Aktivität zu liegen. Aus diesem Grund hängt auch die oszillierende Expression verschiedener Gene in der Maus und dem Huhn von *lfng* ab (Dale et al. 2003, Serth et al. 2003). Die Expression der *Fng* Gene in Vertebraten ist allerdings nicht einheitlich. In der Maus und dem Huhn oszilliert die Expression von *lfng*, doch konnte für den Zebrafisch bislang ein solches Muster nicht beschrieben werden (Leve et al. 2001, Cole et al. 2002, Morales et al. 2002, Dale et al. 2003). Im Falle des Zebrafisches wird *lfng* nicht im PSM ausgeprägt und scheint somit nicht an der Somitogenese beteiligt zu sein (Leve et al. 2001). Das *Fng* Gen der Spinne wird ebenfalls nicht dynamisch ausgeprägt, sondern in einem Muster, das eine Korrelation der Expression mit der Formation der Segmentgrenzen zulässt (Ergebnisse 3.6.1). Das *Fng* an der Bildung der segmentalen Grenzen beteiligt ist, zeigen auch die RNAi Phentypen. Diese ähneln, wie auch bei der Maus, den *Notch* und *Delta* Phentypen (Ergebnisse 3.6.2). Auch hier treten Deformationen der Segmente und deren Grenzen auf, wenngleich die Effekte weniger stark als bei *Notch*, *Dl-1* oder *Dl-2* RNAi Embryonen sind. Dennoch sind die Phentypen mit denen der Maus vergleichbar, zumal auch die dynamische Expression von *Dl-1* im Fall der *Fng* RNAi Embryonen desorganisiert ist (Ergebnisse 3.6.3). Die Notch-Signalkaskade benötigt also *Fng* so-

wohl für die Formation der Segmente als auch für die Etablierung der dynamischen Expressionsmuster.

Die *Fringe* Gene spielen also bei *Drosophila*, der Spinne und den Vertebraten eine zentrale Rolle bei diversen Prozessen, die von der Notch-Signalkaskade reguliert werden. Hierbei steht vor allem die Formation von Grenzen im Vordergrund, wobei *Fng* die *Notch* Aktivität positioniert. Dennoch gibt es auch Unterschiede. Während das *Drosophila* *Fng* Protein die Interaktion von *Notch* mit seinen Liganden moduliert, scheint das *lfng* Protein des Huhns die *Notch* Aktivität direkt zu unterdrücken (Irvine 1999, Dale et al. 2003). Wie die Situation bei der Spinne aussieht, kann zurzeit nicht bestimmt werden. Allerdings kann davon ausgegangen werden, dass auch hier die *Notch* Aktivität über *Fng* reguliert wird.

Doch wie entstehen die Grenzen der Somiten bei Vertebraten oder die dorso-ventrale Grenze in der *Drosophila* Flügel Imaginalscheibe? Gibt es hier vergleichbare Mechanismen und würden sich solche auf den Segmentierungsprozess der Spinne übertragen lassen? Im Fall von *Drosophila* basiert das System auf der Positionierung der *Notch* Aktivität entlang der zu bildenden Grenze. Dort werden dann die Zielgene aktiviert und die Grenze etabliert (Panin et al. 1997). Entsprechend dem Modell nach Blair (1997), wird via *Fng* die *Serrate* Aktivität auf die zukünftige dorsale Seite begrenzt. Das hat zur Folge, dass dort auch eine, gegenüber der ventralen Seite, verringerte *Notch* Aktivität vorliegt. Allerdings kann *Serrate* an der Grenze der *Fng* positiven Zellen *Notch* aktivieren. Auf der ventralen Seite wird *Fng* nicht ausgeprägt und kann somit nur vom dorsalen Bereich aus über die zukünftige Grenze hinweg das *Notch* Signal verstärken. Das führt dazu, dass die höchste *Notch* Aktivität an der Grenze der *Fng* positiven Zellen entsteht und somit dort die dorso-ventrale Grenze gebildet wird. Hier wird also über die Expression von *Fng* die Grenze definiert. Im Fall der Vertebraten Somitogenese könnten vergleichbare Prozesse ablaufen. Hier müssen die Grenzen der zukünftigen Somiten gebildet werden. Dieses geschieht im anterioren Bereich des PSMs, wo neben *Notch* und seinen Liganden auch die oszillierenden Gene ausgeprägt werden. Deren Expression scheint sich in diesem Bereich zu stabilisieren (Saga und Takeda 2001). Um nun eine Grenze bilden zu können, muss eine Art von „Asymmetrie“ vorliegen. Diese könnte wiederum über ein *Fringe* Gen etabliert werden, da die Stabilisierung der oszillierenden *lfng* Expression nur in einer Hälfte des zukünftigen Somits erfolgt. *lfng* könnte in diesem Bereich die *Notch* Aktivität reduzieren, was bedeuten würde, dass dort auch die Zielgene nicht aktiviert werden. Dieser Prozess könnte zur Definition der Somitengrenze führen. Tatsächlich erfolgt die Stabilisierung der dynamischen

Expression, die Repression von *Notch* und auch die Zielgene können auf eine Hälfte des zukünftigen Somits beschränkt sein (del Barco Barrantes et al. 1999, Pourquié 2001a, Saga und Takeda 2001). Jedoch liegen häufig uneinheitliche Daten zu verschiedenen Vertebraten vor, was das Erstellen eines Modells erschwert (vgl. Saga und Takeda 2001).

Dennoch stellt sich die Frage, inwieweit diese Prozesse auch bei der Entstehung der Segmente bei *Cupiennius salei* ablaufen könnten. Dass die Notch-Signalkaskade an der Formation der Segmente beteiligt ist, konnte bereits gezeigt werden. Allerdings ist es im Fall der Spinne nicht möglich, die Expression der einzelnen Gene relativ zueinander zu bestimmen, da kein geeignetes Doppelfärbungsprotokoll zur Verfügung steht. Auch war es häufig nicht möglich, die Expression bestimmter Gene in unterschiedlichen RNAi Embryonen zu testen, da, wie bereits diskutiert (Diskussion 4.1), nicht immer ausreichend Embryonen zur Verfügung standen. Dennoch können die vorhandenen Daten mit denen von *Drosophila* und der Vertebraten verglichen werden.

Die Expression der *Cupiennius* Gene *Notch*, *Dl-2* und *Fng* liefert Hinweise auf einen möglichen Mechanismus. Im anterioren Bereich der Wachstumszone, von wo aus die Segmente entstehen, werden diese Gene in einer segmental wirkenden Domäne ausgeprägt. Diese ist über einen Bereich frei von Expression von einer posterior liegenden Domäne getrennt. Zumindest für *Fng* konnte nachgewiesen werden, dass der freie Bereich mit der Bildung der Segmentgrenze entsteht. Ob dieses auch der Fall für *Notch* und *Dl-2* ist und ob sich die Bereiche entsprechen, konnte bislang noch nicht festgestellt werden. Das Fehlen der Expression könnte darauf schließen lassen, dass die Notch-Signalkaskade dort nicht aktiv ist. Es wäre also möglich, dass z. B. die Expression von *Notch*, vergleichbar zu den Vertebraten, in diesem Bereich herunterreguliert wird. Somit entstünde genau die Art von Asymmetrie, die für die Bildung einer Grenze benötigt wird. Die Regulation von *Notch* könnte hierbei über *Fng* oder auch *Dl-1*, welches dynamisch ausgeprägt wird, geschehen. *Dl-1* könnte eine Art limitierender Faktor sein. Nur dort, wo *Dl-1* ausgeprägt wird, würde dann *Notch* aktiv. Wenn sich dieses auf eine Hälfte des entstehenden Segments bezieht, würde das ebenfalls zur Entstehung von Grenzen führen. *Fng* könnte in solch einem Szenario die Signalübertragung via *Dl-2* inhibieren.

Bislang besteht aber weder die Möglichkeit die *Notch* Aktivität, welche nicht mit der Expression übereinstimmen muss, zu bestimmen, noch wurde die Repression der *Notch* Expression nachgewiesen. Somit bleibt ein möglicher Mechanismus im Bereich der Spekulation. Nur die RNAi Phenotypen weisen bislang eine Beteiligung der Notch-Signalkaskade am Segmentierungsprozess der Spinne nach. Die einzelnen Expressionsmuster müssen

weiter ausgewertet werden, um ein Modell aufstellen zu können. Dennoch gibt es Gemeinsamkeiten in der Bildung von entwicklungsbiologisch relevanten Grenzen bei *Drosophila*, Vertebraten und der Spinne.

#### 4.4 Gibt es einen gemeinsamen Ursprung des Segmentierungsprozesses?

Die vorliegenden Ergebnisse zu den Paar-Regel und Gap Gen Homologen der Spinne lassen vermuten, dass die aus *Drosophila* bekannte Segmentierungsgenkaskade nicht vollständig konserviert ist (vgl. Diskussion 4.1 und 4.2). So konnte für die *Cupiennius Krüppel* Gene keine klassische Gap Funktion nachgewiesen werden. Im Fall der Paar-Regel Gen Homologe lassen die Daten darauf schließen, dass zumindest für das Opisthosoma kein doppelsegmentaler Mechanismus vorliegt. Obwohl es also noch nicht möglich scheint, eine Art molekularen Archetyp der Arthropoden-Segmentierung zu definieren, erlauben es die Daten der vorliegenden Arbeit doch, über die Evolution des Segmentierungsprozesses zu spekulieren.

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, ist ein Vergleich der molekularen Segmentierungsmechanismen von Arthropoden, Anneliden und Vertebraten notwendig, um Aussagen über einen möglichen gemeinsamen Ursprung der Segmentierung machen zu können. Hierbei geht es um die Frage, ob der so genannte „Urbilateria“ (de Robertis 1997), also der letzte gemeinsame Vorfahre der bilateral symmetrischen Organismen, segmentiert war oder nicht.

Bislang sprachen jedoch die meisten Daten dafür, dass der Segmentierungsprozess mehrfach unabhängig voneinander entstanden ist. Diese Annahme wird z. B. durch die zurzeit akzeptierte Metazoen Phylogenie und die Tatsache, dass bei Vertebraten das Mesoderm, bei Arthropoden aber das Ektoderm segmentiert wird unterstützt (Aguinaldo et al. 1997, Davis und Patel 1999, de Rosa et al. 1999). Zwar wurde die Beteiligung von *hairy* Homologen bei der Segmentierung von *Drosophila* und Vertebraten zunächst auf einen gemeinsamen Mechanismus und damit auch auf einen möglichen gemeinsamen Ursprung zurückgeführt, doch zeigten weitere Analysen, dass dieses wohl nicht zutrifft (Müller et al. 1996, de Robertis 1997, Palmeirim et al. 1997, Holley et al. 2000).

Die Beteiligung der Notch-Signalkaskade am Segmentierungsprozess der Spinne und der Vertebraten unterstützt allerdings die These, dass der Segmentierungsmechanismus konserviert sein könnte. Somit wäre der letzte gemeinsame Vorfahre der Arthropoden und Vertebraten segmentiert gewesen. An einem solch ursprünglichen Mechanismus wären wohl auch *hairy* Homologe beteiligt, da sowohl bei der Spinne, als auch bei den Vertebraten die Expression von *hairy* Homologen über die Notch-Signalkaskade organisiert wird. Dieser Mechanismus wäre bei den Vertebraten erhalten geblieben. Im Verlauf der Evolution der Arthropoden, wäre das System, welches *hairy* reguliert, dann allerdings modifiziert worden. Während es bei den Cheliceraten erhalten blieb, wird *hairy* zumindest in den höheren Insekten über die Gap- und andere Paar-Regel Gene reguliert (Ingham 1988, St. Johnston und Nüsslein-Volhard 1992, Davis und Patel 2002).

Eine Konsequenz aus solch einem Szenario wäre, dass der ursprüngliche Segmentierungsprozess der Arthropoden eher dem der Vertebraten ähnelt und bestimmte Aspekte bei *Drosophila* stark abgeleitet wären. Im Falle von *Drosophila* scheint die Notch-Signalkaskade nicht an der Körpersegmentierung beteiligt zu sein (Davis und Patel 1999). Dieses ist im Grunde auch nicht möglich oder nötig, da bei *Drosophila* die Spezifikation der Segmente ausgehend von syncytialen Stadien geschieht und auf der freien Diffusion von Transkriptionsfaktoren basiert, die Notch-Signalkaskade aber dient der Zell-Zell Kommunikation (zur Übersicht: Ingham 1988, St. Johnston und Nüsslein-Volhard 1992, Artavanis-Tsakonas et al. 1999). Dennoch gibt es Hinweise darauf, dass die Notch-Signalkaskade auch bei Insekten eine Rolle während der Segmentierung spielen könnte. So wird das *Schistocerca Fringe* Gen in neu formierten Segmenten ausgeprägt und auch das *Drosophila Serrate* Gen weist eine segmentale Expression auf (Wiellette et al. 1999, Dearden und Akam 2000). Dennoch scheint in beiden Fällen keine Funktion bei der Etablierung der Segmente vorzuliegen, da die Expression der Gene erst nach der Formation der Segmente zu beobachten ist.

Aber sind solche Expressionsmuster, wie im Fall des *Schistocerca Fringe* Gens, eine Art „Überbleibsel“ einer ursprünglichen Segmentierungsfunktion oder wurde die Notch-Signalkaskade hier unabhängig rekrutiert? Eine solche unabhängige Rekrutierung kann nicht ausgeschlossen werden, da die Notch-Signalkaskade an vielen unterschiedlichen Prozessen beteiligt ist, was auf diverse Rekrutierungsereignisse schließen lässt (Artavanis-Tsakonas et al. 1999, Baron et al. 2002). Somit besteht die Möglichkeit, dass die Beteiligung der Notch-Signalkaskade am Segmentierungsprozess der Vertebraten und der Spinne

auf eine voneinander unabhängige Nutzung dieser Kaskade zurückzuführen ist. Das würde bedeuten, dass die Segmentierungsmechanismen unabhängig voneinander entstanden sind und es keinen gemeinsamen Ursprung der Segmentierung gäbe.

Falls *Notch* aber an einem für Arthropoden basalen Segmentierungsmechanismus beteiligt ist, könnte man nicht nur erwarten, dass „Überbleibsel“ auftreten, sondern auch, dass *Notch* bei anderen Arthropoden eine Rolle beim Segmentierungsprozess spielen würde. Hierzu müssten die Funktionen von *Notch* bei den Crustaceen, Myriapoden und weiteren Insekten untersucht werden. Es muss also zunächst bestimmt werden, ob bei Arthropoden die Beteiligung von *Notch* an der Segmentierung nicht auf die Cheliceraten beschränkt ist. Um dann genauere Aussagen über den Ursprung der Segmentierung machen zu können, wäre es notwendig auch mögliche Funktionen der Notch-Signalkaskade bei der Segmentierung der Anneliden zu untersuchen.

Obwohl also weitere Untersuchungen notwendig sein werden, um die Frage nach dem Ursprung der Segmentierung beantworten zu können, liefert die Beteiligung der Notch-Signalkaskade an der Segmentierung der Spinne und der Vertebraten einen starken Hinweis auf einen gemeinsamen Ursprung des Segmentierungsprozesses.

## 5. Literaturverzeichnis

- Aguinaldo A.M., Turbeville J.M., Linford L.S., Rivera M.C., Garey J.R., Raff R.A. and Lake J.A. (1997). Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature* 387, 489-493.
- Akiyama-Oda Y. and Oda H. (2003). Early patterning of the spider embryo: a cluster of mesenchymal cells at the cumulus produces Dpp signals received by germ disc epithelial cells. *Development* 130, 1735-1747.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Meyers E.W. and Lippman D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- Anderson D.T. (1973). Embryology and phylogeny in annelids and arthropods. *Oxford: Pergamon Press*, 365-451.
- Artavanis-Tsakonas S., Rand D. and Lake R.J. (1999). Notch Signaling: Cell fate control and signaling in development. *Science* 284, 770-776.
- Aulehla A., Wehrle C., Brand-Saberi B., Kemler R., Gossler A., Kanzler B. and Herrmann B.G. (2003). *Wnt3a* plays a major role in the segmentation clock controlling somitogenesis. *Dev. Cell* 4, 395-406.
- Bailey A.M. and Posakony J.W. (1995). *Suppressor of Hairless* directly activates transcription of *Enhancer of split Complex* genes in response to Notch receptor activity. *Genes Dev.* 9, 2609-2622.
- Baonza A. and Freeman M. (2001). Notch signalling and the initiation of neural development in the *Drosophila* eye. *Development* 128, 3889-3998.
- Baron M., Aslam H., Flasza M., Fostier M., Higgs S.L. and Wilkin M.B. (2002). Multiple levels of Notch signal regulation. *Mol. Memb. Biol.* 19, 27-38.
- Bessho Y., Sakata R., Komatsu S., Shiota K., Yamada S. and Kageyama R. (2003). Dynamic expression and essential functions of *Hes7* in somite segmentation. *Genes Dev.* 15, 2642-2647.
- Blair S.S. (1997). Limb development: Marginal *Fringe* benefits. *Curr. Biol.* 7, R686-R690.
- Brown S.J., Hilgenfeld R.D. and Denell R.E. (1994). The beetle *Tribolium castaneum* has a *fushi tarazu* homolog expressed in stripes during segmentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 12922-12926.
- Brown S.J. and Denell R.E. (1996). Segmentation and dorsoventral patterning in *Tribolium*. *Semin. Cell Dev. Biol.* 7, 553-560.
- Brückner K., Perez L., Clausen H. and Cohen S. (2000). Glycosyltransferase activity of *Fringe* modulates Notch-Delta interactions. *Nature* 406, 411-415.
- Budd G.E. (2001). Why are arthropods segmented? *Evo. Dev.* 3:5, 332-342.

Cole S.E., Levorse J.M., Tilghman S.M. and Vogt T.F. (2002). Clock regulatory elements control cyclic expression of *Lunatic fringe* during Somitogenesis. *Dev. Cell* 3, 75-84.

Conlon R.A., Reaume A.G. and Rossant J. (1995). *Notch1* is required for the coordinate segmentation of the somites. *Development* 121, 1533-1545.

Dale J.K., Maroto M., Dequeant M.-L., Malapert P., McGrew M. and Pouquié O. (2003). Periodic *Notch* inhibition by *Lunatic Fringe* underlies the chick segmentation clock. *Nature* 421, 275-278.

Damen W.G.M. and Tautz D. (1998). A Hox class 3 orthologue from the spider *Cupiennius salei* is expressed in a Hox-gene-like fashion. *Dev. Genes Evol.* 208, 586-590.

Damen W.G.M. and Tautz D. (1999). *Abdominal-B* expression in a spider suggests a general role for *Abdominal-B* in specifying the genital structure. *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)* 285, 85-91.

Damen W.G.M., Weller M. and Tautz D. (2000). Expression patterns of *hairy*, *even-skipped* and *runt* in the spider *Cupiennius salei* imply that these genes were segmentation genes in a basal arthropod. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 4515-4519.

Damen W.G.M. (2002a). Parasegmental organization of the spider embryo implies that the parasegment is an evolutionary conserved entity in arthropod embryogenesis. *Development* 129, 1239-1250.

Damen W.G.M. (2002b). *fushi tarazu*: a Hox gene changes its role. *BioEssays* 24, 992-995.

Davis G.K. and Patel N.H. (1999). The origin and evolution of segmentation. *Trends Genet.* 15, M68-M72.

Davis G.K., Jaramillo C.A. and Patel N.H. (2001). Pax group III genes and the evolution of insect pair-rule patterning. *Development* 128, 3445-3458.

Davis G.K. and Patel N.H. (2002). Short, long, and beyond: molecular and embryological approaches to insect segmentation. *Annu. Rev. Entomol.* 47, 699-699.

Davis G.K. and Patel N.H. (2003). Playing by pair-rules? *BioEssays* 25, 425-429.

Davis R.L. and Turner D.L. (2001). Vertebrate hairy and Enhancer of split related proteins: transcriptional repressors cellular differentiation and embryonic patterning. *Oncogene* 20, 8342-8357.

Dawes R., Dawson I., Falciani F., Tear G. and Akam M. (1994). *Dax*, a locust Hox gene related to *fushi-tarazu* but showing no pair-rule expression. *Development* 120, 1561-1572.

Dearden P. and Akam M. (2000). A role for *Fringe* in segment morphogenesis but not segment formation in the grasshopper *Schistocerca gregaria*. *Dev. Genes Evol.* 210, 329-336.



- Dearden P.K., Donly C. and Grbic M. (2002). Expression of pair-rule gene homologues: early patterning of the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*. *Development* 129, 5461-5472.
- del Barco Barrantes I., Elia A.J., Wunsch K., Hrabe de Angelis M., Mak T.W., Rossant J., Colon R.A., Gossler A. and de la Pompa J.L. (1999). Interaction between *Notch* signaling and *Lunatic fringe* during somite boundary formation in the mouse. *Curr. Biol.* 9, 470-480.
- de Robertis E.M. (1997). The ancestry of segmentation. *Nature* 387, 25-26.
- de Rosa R., Grenier K.G., Andreeva T., Cook C.E., Adoutte A., Akam M., Carrol S.B. and Balavoine G. (1999). Hox genes in brachiopods and priapulids and protostome evolution. *Nature* 399, 772-776.
- Driever W. and Nüsslein-Volhard C. (1988a). A gradient of bicoid protein in *Drosophila* embryos. *Cell* 54, 83-93.
- Driever W. and Nüsslein-Volhard C. (1988b). The bicoid protein determines positions in the *Drosophila* embryo in a concentration-dependent manner. *Cell* 54, 95-104.
- Dubrulle J., McGrew J. and Pourquié O. (2001). FGF signaling controls somite boundary position and regulates segmentation clock control of spatiotemporal *Hox* gene activation. *Cell* 106, 219-232.
- Evrard Y.A., Lun Y., Aulehla A., Gan L. and Johnson R.L. (1998). *Lunatic fringe* is an essential mediator of somite segmentation and patterning. *Nature* 394, 377-381.
- Fay D.S., Stanley H.M., Han M. and Wood W.B. (1999). A *Caenorhabditis elegans* homologue of *hunchback* is required for late stages of development but not early embryonic patterning. *Dev. Biol.* 205, 240-253.
- Gajewski M. and Voolstra C. (2002). Comparative analysis of somitogenesis related genes of the *hairy/Enhancer of split* class in Fugo and zebrafish. *BMC Genomics* 3, 21.
- Gaul U. and Weigel D. (1991). Regulation of *Krüppel* expression in the anlage of the Malpighian tubules in the *Drosophila* Embryo. *Mech. Dev.* 33, 57-67
- Henry C.A., Urban M.K., Dill K.K., Merlie J.P., Page M.F., Kimmel C.B. and Amacher S.L. (2002). Two linked *hairy/Enhancer of split-related* genes, *her1* and *her7*, function together to refine alternated somite boundaries. *Development* 129, 3693-3704.
- Hirata H., Yoshiura S., Ohtsuka T., Bessoh Y., Harada T., Yoshikawa K. and Kageyama R. (2003). Oscillatory expression of the bHLH factor *Hes1* regulated by a negative feedback loop. *Science* 298, 840-843.
- Holley S.A., Geisler R. and Nüsslein-Volhard C. (2000). Control of *her1* expression during zebrafish somitogenesis by a *delta*-dependent oscillator and an independent wave-front activity. *Genes Dev.* 14, 1678-1690.
- Holley S.A., Julich D., Rauch G.J., Geisler R. and Nüsslein-Volhard C. (2002). *her1* and the notch pathway function within the oscillator mechanism that regulates zebrafish somitogenesis. *Development* 129, 1175-1183.

- Hrabe de Angelis M., McIntyre J. and Gossler A. (1997). Maintenance of somite borders in mice requires the *Delta* homologue *Dll1*. *Nature* 386, 717-721.
- Hughes C.L. and Kaufman T.C. (2002a). Exploring the Myriapod body plan: expression patterns of the ten Hox genes in a Centipede. *Development* 129, 1225-1238.
- Hughes C.L. and Kaufman T.C. (2002b). Exploring Myriapod segmentation: The expression patterns of *even-skipped*, *engrailed*, and *wingless* in a Centipede. *Dev. Biol.* 247, 47-61.
- Hülskamp M., Pfeifle C. and Tautz D. (1990). A morphogenetic gradient of hunchback protein organizes the expression of the gap genes *Krüppel* and *knirps* in the early *Drosophila* embryo. *Nature* 346, 577-580.
- Ingham P.W. (1988). The molecular genetics of embryonic pattern formation in *Drosophila*. *Nature* 335, 25-34.
- Irvine K.D. (1999). *Fringe*, *Notch*, and making developmental boundaries. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9, 434-441.
- Irvin I.M. and Martindale M.Q. (1996). Cellular and molecular mechanisms of segmentation in annelids. *Sem. Cell Dev. Biol.* 7, 593-604.
- Iso T., Kedes L. and Hammamori Y. (2003). HES and HRP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J. Cell. Physiol.* 194, 237-255.
- Iwasa, J.H., Suver D.W. and Savage R.M. (2000). The leech hunchback protein is expressed in the epithelium and CNS but not in the segmental precursor lineages. *Dev. Genes Evol.* 210, 277-288.
- Jen W.-C., Turner D., Chitnis A. and Kintner C. (1997). The Notch ligand, X-Delta-2 mediates segmentation of the paraxial mesoderm in *Xenopus* embryos. *Development* 124, 1169-1178.
- Jiang Y.J., Aerne B.L., Smithers L., Haddon C., Ish-Horowicz D. and Lewis J. (2000). Notch signalling and the synchronization of the somite segmentation clock. *Nature* 408, 475-479.
- Johnston S.H., Rauskolb C., Wilson R., Prabhakaran B., Irvine K.D. and Vogt T. F. (1997). A family of mammalian *Fringe* genes implicated in boundary determination and the *Notch* pathway. *Development* 124, 2245-2254.
- Jouve C., Palmeirim I., Henrique D., Beckers J., Gossler A., Ish-Horowicz D. and Pourquié O. (2000). Notch signalling is required for cyclic expression of the hairy-like gene HES1 in the presomitic mesoderm. *Development* 127, 1421-1429.
- Kang D., Huang F., Dongling L., Shankland M., Gaffield W. and Weisblat D.A. (2003). A *hedgehog* homolog regulates gut formation in leech (*Helobdella*). *Development* 130, 1645-1657.

- Keller R. (2002). Shaping the vertebrate body plan by polarized embryonic cell movements. *Science* 298, 1950-1954.
- Kennerdell J.R. and Carthew R.W. (1998). Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that *frizzled* and *frizzled2* act in the *Wingless* pathway. *Cell* 95, 1017-1026.
- Klingler M. and Gergen P. (1993). Regulation of *runt* transcription by *Drosophila* segmentation genes. *Mech. Dev.* 43, 3-19.
- Klingler M. and Tautz D. (1999). Axis and pattern formation in *Drosophila*. In: *Developmental Genetics, Epigenetics and Environmental Regulation* (Eds. Russo, E., Cove D., Edgar L., Jaenisch R. and Salamini F.) Springer-Verlag, Heidelberg. pp 311-330.
- Koelzer S. and Klein T. (2003). A Notch-independent function of *Suppressor of Hairless* during the development of the bristle sensory organ precursor cell of *Drosophila*. *Development* 130, 1973-1988.
- Leve C., Gajewski M., Rohr K.B. and Tautz D. (2001). Homologues of *c-hairy1* (*her9*) and *lunatic fringe* in zebrafish are expressed in the developing central nervous system, but not in the presomitic mesoderm. *Dev. Genes Evol.* 211, 493-500.
- Maderspacher F., Bucher G. and Klingler M. (1998). Pair-rule and gap gene mutants in the flour beetle *Tribolium castaneum*. *Dev. Genes Evol.* 208, 558-568.
- Martinez Arias A., Zecchini V. and Brennan K. (2002). CSL-independent Notch signaling: a checkpoint in cell fate decisions during development? *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 524-533.
- Minelli A. (2001). A three-phase model of segmentation. *Dev. Genes Evol.* 211, 509-521.
- Moloney D.J., Panin V.M., Johnston S.H., Chen J., Shao L., Wilson R., Wang Y., Stanley P., Irvine K.D., Haltiwanger R.S. and Vogt T.F. (2000). Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch. *Nature* 406, 369-375.
- Morales A.V., Yasuda Y. and Ish-Horowicz D. (2002). Periodic *Lunatic fringe* expression is controlled during segmentation by a cyclic transcriptional enhancer responsive to Notch signaling. *Dev. Cell* 3, 63-74.
- Mouchel-Vielh E., Blin M., Rigolot C. and Deutsch J.S. (2002). Expression of a homologue of the *fushi tarazu* (*ftz*) gene in a cirripede crustacean. *Evol. Dev.* 4, 76-85.
- Müller M., v Weizäcker E. and Campos-Ortega J.A. (1996). Expression domains of a zebrafish homologue of the *Drosophila* pair-rule gene *hairy* correspond to primordia of alternating somites. *Development* 122, 2071-2078.
- Noll M. (1993). Evolution of Pax genes, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4, 595-605.
- Nüsslein-Volhard C. and Wieschaus E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287, 795-801.
- Oates A.C. and Ho R.J. (2002). *Hairy/E(spl)-related (Her)* genes are central components of the segmentation oscillator and display redundancy with the Delta/Notch signaling

pathway in the formation of anterior segmental boundaries in the zebrafish. *Development* 129, 2929-2946.

Oka C., Nakano T., Wakeham A., de la Pompa J.L., Mori C., Sakai T., Okazaki S., Kwai-chi M., Shiota K., Mak T.W. and Honjo T. (1995). Disruption of the mouse *RBP-Jk* gene results in early embryonic death. *Development* 121, 3291-3301.

Palmeirim I., Henrique D., Ish-Horowicz D. and Pourquié O. (1997). Avian *hairy* gene expression identifies a molecular clock linked to vertebrate segmentation and somitogenesis. *Cell* 91, 639-648.

Panin V.M., Papayannopoulos R.W. and Irvine K.D. (1997). Fringe modulates Notch-ligand interactions. *Nature* 387, 908-912.

Pankratz M. and Jäckle H. (1993). Blastoderm segmentation. In: *Development of Drosophila melanogaster*. (Eds. Bate M. and Martinez-Arias A.) Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp 467- 516.

Patel N.H., Ball E.E. and Goodman C.S. (1992). Changing role of *even-skipped* during the evolution of insect pattern formation. *Nature* 357, 339-342.

Patel N.H. (1994). The evolution of arthropod segmentation: insights from comparisons of gene expression patterns, *Development Supplement*, 201-207.

Patel N.H., Condrón B.G. and Zinn K. (1994). Pair rule expression patterns of *even-skipped* are found in both short- and long-germ beetles. *Nature* 367, 429-434.

Patel N.H., Hayward D.C., Lall S., Pirkel N.R., DiPietro D. and Ball E.E. (2001). Grasshopper *hunchback* expression reveals conserved and novel aspects of axis formation and segmentation. *Development* 128, 3459-3472.

Pourquié O. (1999). Notch around the clock. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9, 599-565.

Pourquié O. (2001a). Vertebrate Somitogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17, 311-350.

Pourquié O. (2001b). The vertebrate segmentation clock. *J. Anat.* 199, 169-175.

Rauskolb C. and Irvine K.D. (1999). Notch-Mediated segmentation and growth control of the *Drosophila* leg. *Dev. Biol.* 210, 339-350.

Reibeiz M., Reeves N.L. and Posakony J.W. (2002). SCORE: A computational approach to the identification of cis-regulatory modules and target genes in whole-genome sequence data. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 9888-9893.

Rohr K.B., Tautz D. and Sander K. (1999). Segmentation gene expression in the mothmidge *Clogmia albipunctata* (Diptera, psychodidae) and other primitive dipterans. *Dev. Genes Evol.* 209, 145-154.

Romani S., Jimenez F., Hoch M., Patel N.H., Taubert U. and Jäckle H. (1996). *Krüppel*, a *Drosophila* segmentation gene, participates in the specification of neuron and glial cells. *Mech. Dev.* 60, 95-107.

- Rosenberg U.B., Schröder C., Preiss A., Kienlin A., Côté S., Riede I. and Jäckle H. (1986). Structural homology of the product of the *Drosophila Krüppel* gene with *Xenopus* transcription factor IIIA. *Nature* 319, 336-339.
- Saga Y. and Takeda H. (2001). The making of a somite: molecular events in vertebrate segmentation. *Nature Reviews Genetics* 2, 835-845.
- Sambrook J., Fritsch E.F and Maniatis T. (1989). Molecular Cloning. A laboratory manual (second edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Vol. 1-3
- Sander K. (1976). Specification of the basic body plan pattern in insects embryogenesis. *Adv. Insect Physiol.* 12, 125-238.
- Scholtz G. (2002). The Articulata hypothesis – or what is a segment. *Org. Divers. Evol.* 2, 197-215.
- Schoppmeier M. and Damen W.G.M. (2001). Double-stranded RNA interference (RNAi) in the spider *Cupiennius salei*: the role of *Distal-less* is evolutionary conserved. *Dev. Genes Evol.* 211, 76-82.
- Schröder R., Jay D.G. and Tautz D. (1999). Elimination of EVE protein by CALI in the short germ band insect *Tribolium* suggests a conserved pair rule function for *even skipped*. *Mech. Dev.* 80, 191-195.
- Schröder R. (2003). The genes *orthodenticle* and *hunchback* substitute for *bicoid* in the beetle *Tribolium*. *Nature* 422, 621-625.
- Seaver E.C., Paulson D.A. Irvine S.Q. and Martindale M.Q. (2001). The spartial and temporal expression of *Ch-en*, the *engrailed* gene in the polychaete *Chaetopterus*, does not support a role in body axis segmentation. *Dev. Biol.* 236, 195-209.
- Seaver E.C. and Shankland (2001). Establishment of segment polarity in the ectoderm of the leech *Helobdella*. *Development* 128, 1629-1641.
- Seitz K.A. (1966). Normale Entwicklung des Arachniden *Cupiennius salei* Keyserling und seine Regenerationsfähigkeit nach Röntgenbestrahlung. *Zool. Jb. Anat.* Bd. 83, 327-447.
- Serth K., Schuster-Gossler K., Cordes R. and Gossler A. (2003). Transcriptional oscillations of *Lunatic fringe* is essential for somitogenesis. *Genes Dev.* 17, 912-925.
- Sieger D., Tautz D. and Gajewski M. (2003). The role of *suppressor of Hairless* mediated signalling during zebrafish somitogenesis. *Mech. Dev.* in press
- Sommer R.J. and Tautz D. (1991). Segmentation gene expression in the housefly *Musca domestica*. *Development* 113, 419-439.
- Sommer R.J., Retzlaff M., Goerlich K., Sander K. and Tautz D. (1992). Evolutionary conservation pattern of zinc-finger domains of *Drosophila* segmentation genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10782-10786.

- Sommer R.J. and Tautz D. (1993). Involvement of an orthologue of the *Drosophila* pair-rule gene *hairy* in segment formation of the short germ-band embryo of *Tribolium* (Coleoptera). *Nature* 361, 448-450.
- Song M.S., Huang F.Z., Chang G.Y. and Weisblat D.A. (2002). Expression and function of an *even-skipped* homolog in the leech *Helobdella robusta*. *Development* 129, 3681-3692.
- St. Johnston D. and Nüsslein-Volhard C. (1992). The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell* 68, 201-219.
- Stollewark A. (2002). Recruitment of cell groups through Delta/Notch signalling during spider neurogenesis. *Development* 129, 5339-5348.
- Stollewark A., Schoppmeier M. and Damen W.G.M. (2003). Involvement of *Notch* and *Delta* genes in spider segmentation. *Nature* 423, 863-865.
- Stuart J.J., Brown S.J., Beeman R.W. and Denell R.E. (1991). A deficiency of the homeotic complex of the beetle *Tribolium*. *Nature* 350, 72-74.
- Tautz D. and Pfeifle C. (1989). A non-radioactive *in situ* hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene *hunchback*. *Chromosoma* 98, 81-85.
- Tautz D., Friedrich M. and Schröder R. (1994). Insect embryogenesis- what is ancestral and what is derived? *Development Supplement*, 193-199.
- Tautz D. and Sommer R. (1995). Evolution of segmentation genes in insects. *Trends Genet.* 11, 23-27.
- Tautz D. (2000). Evolution of transcriptional regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10, 575-579.
- Telford M.J. (2000). Evidence for the derivation of the *Drosophila fushi tarazu* gene from a Hox gene orthologous to lophotrochozoan *Lox5*. *Curr. Biol.* 10, 349-253.
- Tuschl T., Zamore P.D., Lehmann R., Bartel D.P. and Sharp P.A. (1999). Target mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes and Dev.* 13, 3191-3197.
- van Eeden F.J., Grant M., Schach U., Brand M., Furutani-Seiki M., Haffter P., Hamerschmidt M., Heisenberg C.-P., Jiang Y.-J., Kane D., Kelsh R.N., Mullins M.C., Oden- tahl J., Warg R.M., Allende M.L., Weinberg E.S. and Nüsslein-Volhard C. (1996). Mutations affecting somite formation and patterning in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 123, 153-164.
- Wallingford J.B., Fraser S.E. and Harland R.M. (2002). Convergent extension: The molecular control of polarized cell movement during embryonic development. *Dev. Cell* 2, 695-706.
- Wargelius A., Ellingsen S. and Fjose A. (1999). Double-stranded RNA induces specific developmental defects in zebrafish embryos *Biochem. Biophys. Res. Commu.* 263, 156-161.

- Weisblat D.A., Price D.J. and Weeden C.J. (1988). Segmentation in leech development. *Development* Supplement 104, 161-168.
- Werbrock A.H., Meiklejohn D.A., Sainz A., Iwasa J.H. and Savage R.M. (2001). A polychaete *hunchback* ortholog. *Dev. Biol.* 235, 476-488.
- Wiellette E.L. and McGinnis W. (1999). Hox genes differentially regulate *Serrate* to generate segment-specific structures. *Development* 126, 1985-1995.
- Wolff C., Sommer R., Schröder R., Glaser G. and Tautz D. (1995). Conserved and divergent expression aspects of the *Drosophila* segmentation gene *hunchback* in the short germ band embryo of the flour beetle *Tribolium*. *Development* 121, 4227-4236.
- Wolff C., Schröder R., Schulz C., Tautz D. and Klingler M. (1998). Regulation of the *Tribolium* homologues of *caudal* and *hunchback* in *Drosophila*: evidence for maternal gradient systems in a short germ embryo. *Development* 125, 3645-3654.
- Zhang N. and Gridley T. (1998). Defects in somite formation in *lunatic fringe*-deficient mice. *Nature* 394, 374-377.

**Anhang 1: Die *Cupiennius salei* pairberry Sequenzen***pairberry-1:*

1	CAGCTGGGGGGGTGTTTATTAATGGAAGACCTCTTCCGAACCACATACGATTGAAAATC	60
1	Q L G G V F I N G R P L P N H I R L K I	20
61	GTCGAATTGGCAGCAGCTGGTGTGAGGCCATGTGTCATCAGCCGCAAGCTGAGAGTATCA	120
21	V E L A A A G V R P C V I S R K L R V S	40
121	CACGGCTGCGTGTCGAAAATCCTGAACAGATACCAAGAAACGGGCAGCATTTCGGCCCCGGC	180
41	H G C V S K I L N R Y Q E T G S I R P G	60
181	GTTATCGGAGGAAGTAAACCCCGTGTAGCGACTCCAGAAGTAGAAAAGAAAATCGAAGAA	240
61	V I G G S K P R V A T P E V E K K I E E	80
241	TATAAACGCGACAGTCCTGGCATTTCCTGAGCTGGGAAATTAGAGACCGGCTAATTAAGGAA	300
81	Y K R D S P G I F S W E I R D R L I K E	100
301	GGAATTTGCGATAAGAGCACTGCTCCAAGCGTCAGCTCAATCAGCCGGGTCTAAGAGGA	360
101	G I C D K S T A P S V S S I S R V L R G	120
361	TCTCGAGCGGGTTCAGATCAGGTGATTCTGGAAGCGACTCTGCGGATGGCTCCAGCAGA	420
121	S R A G S R S G D S G S D S A D G S S R	140
421	AAAGCTGATCATAGTATCGATGAGATTCTTGGGGGTGGAACAAATGATATTGATTCAGAT	480
141	K A D H S I D E I L G G G T N D I D S D	160
481	TGCGACTCAGAACCTGGCATTCTTTAAAAAGGAAGCAAAGACGTTTCGAGAACTACCTTT	540
161	C D S E P G I P L K R K Q R R S R T T F	180
541	AGCGCAGAGCAACTAGAATTGCTGGAAAAAGCATTGAAAGGACTCAATATCCAGATGTC	600
181	S A E Q L E L L E K A F E R T Q Y P D V	200
601	TACACTCGCGAAGAGCTTGCGCAGAGGACAAAGTTAACTGAAGCCCGCATTCAGTATGG	660
201	Y T R E E L A Q R T K L T E A R I Q V W	220
661	T	

*pairberry-2:*

1	CAGCTGGGAGGAGTGTGTTTATAAATGGCCGACCACTGCCGAACCACATTCGCCTGAAAATC	60
1	Q L G G V F I N G R P L P N H I R L K I	20
61	GTGGAGCTGGCCGCCGCTGGCGTCCGCCCCTGCGTCATCAGTCGCCAACTGCGCGTCAGC	120
21	V E L A A A G V R P C V I S R Q L R V S	40
121	CACGGCTGCGTCTCCAAGATTCTCAACCGGTACCAGGAAACGGGCTCCATCCGCCCTGGC	180
41	H G C V S K I L N R Y Q E T G S I R P G	60
181	GTCATCGGCGGCAGCAAGCCCCGTGTGGCCACGCCGGACATCGAGAAGCGCATCGAAGAC	240
61	V I G G S K P R V A T P D I E K R I E D	80
241	TACCGCAAGGAGAATCCAGGTATCTTTTCTGGGAGATTTCGCGACCGCCTCATCAAGGAG	300
81	Y R K E N P G I F S W E I R D R L I K E	100
301	GGTCTCTGCGACCGCACCCACCGCCCCCTCCGTCAGCTCCATCAGCCGCCTGCTCAGGGGA	360
101	G L C D R T T A P S V S S I S R L L R G	120



361	CCGAATGGATCGATGAGGGGTGACGGCGGAATGGACGGTCATGGCCCGGAGGAGGAATG	420
121	P N G S M R G D G G M D G H G P G G G M	140
421	GGCGGAGGCGGAGGTGGCGGTGGTGGCGGACACAAAGGACAGCACAAAGCACTCCATCGAG	480
141	G G G G G G G G G G H K G Q H K H S I E	160
481	GGCATCCTCGCCGGGACAAAGAGTGACCTTGGAGACTCAGGCAGCGAGGACAGCGACGCC	540
161	G I L A G D K S D L G D S G S E D S D A	180
541	GAGCCGGGGCTGACGCTGAAGCGGAAACAGCGCCGTTCCCGGACCACCTTCACCGCCAC	600
181	E P G L T L K R K Q R R S R T T F T A H	200
601	CAGCTGGACGAGCTGGAGAAGGCCTTCGAGCGGACACAGTACCCCGACATCTACACTCGC	660
201	Q L D E L E K A F E R T Q Y P D I Y T R	220
661	GAAGGGCGGATCCCCC	676
221	E G R I P	226

*pairberry-3:*

1	CCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGATCC	60
1	P L E V D G I D K L D I E F L Q P G G S	20
61	GCCCTAGGTGGGGTGTTTATAAATGGTAGACCACTTCCAAATCATATCAGATTGAAAATT	120
21	A L G G V F I N G R P L P N H I R L K I	40
121	GTTGAATTAGCGGCTGCGGGAGTCAGACCATGTGTTATAAGTCGAAAGCTACGTGTATCC	180
41	V E L A A A G V R P C V I S R K L R V S	60
181	CATGGATGTGTATCGAAAATATTAAATAGATATCAGGAAACAGGCAGCATTTCGACCAGGA	240
61	H G C V S K I L N R Y Q E T G S I R P G	80
241	GTCATAGGGGGTAGTAAACCTCGTGTGCTACTCCTGAGGTTGAAAAGAAAATAGAGGAA	300
81	V I G G S K P R V A T P E V E K K I E E	100
301	TACAAACAGGATAGTCCAGGCATTTTCAGCTGGGAGATCAGAGATAGACTCATAAATGAT	360
101	Y K Q D S P G I F S W E I R D R L I N D	120
361	GGAATATGCGATAAAAGCACAGTGCCGAGTGTTAGCTCTATCAGCCGGTTCTGAGGGGC	420
121	G I C D K S T V P S V S S I S R V L R G	140
421	TCCCGAGCGGGATCGAGGTCTGCCGATTCCGGAAGCGAATCTGCCGATGGTTCATGCCGT	480
141	S R A G S R S A D S G S E S A D G S C R	160
481	AAAGCCGATCACAGTATCGACGGGATTCTTGGAGGTCGTTTGAATGATGAAGATTCAGAG	540
161	K A D H S I D G I L G G R L N D E D S E	180
541	TGTGATTCAGAACCTGGTATTACACTTAAAAGAAAACAAAGACGCTCGAGAACAACCTTT	600
181	C D S E P G I T L K R K Q R R S R T T F	200
601	AGCACAGAGCAATTAGACATGTTGGAAAAAGCCTTCGAAAGGTCTCAGTACCCCGACATC	660
201	S T E Q L D M L E K A F E R S Q Y P D I	220
661	TATACGCGCGAG	672
221	Y T R E	224

*pairberry-4:*

1	CAGCTGGGAGGGGTATTCATTAATGGTCGCCCTCTGCCCAACCATGTCCGGCTAAAAATC	60
1	Q L G G V F I N G R P L P N H V R L K I	20
61	GTGGAATTAGCAGCGGCCGGCGTCCGACCCTGTGTTATATCCAGAAAACCTAAGGGTGTCA	120
21	V E L A A A G V R P C V I S R K L R V S	40
121	CATGGATGCGTATCAAAGATCCTCAACAGATATCAGGAAACAGGAAGTATCAGGCCTGGT	180
41	H G C V S K I L N R Y Q E T G S I R P G	60
181	GTAATTGGTGGAAAGTCGACCTAAATCGTCGGTGGATTCCGATACTCGTTCCACAGACGAC	240
61	V I G G S R P K S S V D S D T R S T D D	80
241	TGTGGCAAGAAAGAGGGTTCGAACCTGTTTCGGATGGGAGGTTTCGAGACCGTGTATCCAAA	300
81	C G K K E G S N L F G W E V R D R V S K	100
301	GAAATGAAAGTTCTCCGTCTCGGAAAGACAGATGAAACAGACAAAGGTCACAATAAACAC	360
101	E M K V L R L G K T D E T D K G H N K H	120
361	TCCATAGATGGAATACTAGCGACAAAGAAAGCAGCGGGTCGTGAAAACAGCGCCGATGAA	420
121	S I D G I L A T K K A A G R E N S A D E	140
421	TGTGGCACCGCGTCGAGACTGTGATTTCAGAACCGGGTTTGACACTGAAAAGGAAGCAACGG	480
141	C G T A S D C D S E P G L T L K R K Q R	160
481	AGGTCCCGGACCACGTTTACAGCAGCTCAACTGGACGAACTCGAGAGAGCTTTCGAAAAG	540
161	R S R T T F T A A Q L D E L E R A F E K	180
541	TCACAGTACCCTGACATCTACACTCGCGAA	570
181	S Q Y P D I Y T R E	190

Dargestellt sind sowohl die Nukleotid- als auch die Aminosäuresequenzen von *pbby-1*, *pbby-2*, *pbby-3* und *pbby-4*. Die 661bp von *pbby-1* enthalten einen ORF von 220aa, die 676bp von *pbby-2* einen ORF von 226aa, die 672bp von *pbby-3* einen ORF von 224aa und die 570bp von *pbby-4* einen ORF von 190aa. aa: Aminosäure, bp: Basenpaare, ORF: offenes Leseraster.

**Anhang 2:** Statistische Auswertung der dynamischen *pby-3* Expression

	<b>Total</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>
<b>0h</b>	63	25 (40%)	25 (40%)	11 (17%)	2 (3%)
<b>1h</b>	58	14 (24%)	25 (43%)	15 (26%)	4 (7%)
<b>2h</b>	71	6 (8,5%)	22 (31%)	32 (45%)	11 (15.5%)
<b>3h</b>	64	1 (2%)	15 (23%)	28 (43%)	10 (15%)
<b>4h</b>	55	0 (0%)	0 (0%)	4 (7.3%)	14 (25.5%)

	<b>A+</b>	<b>B+</b>	<b>C+</b>	<b>D+</b>
<b>0h</b>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>1h</b>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>2h</b>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>3h</b>	11(17%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>4h</b>	18 (32%)	14 (25.5%)	5 (9%)	0 (0%)

Die Embryonen wurden im Abstand von einer Stunde fixiert (0h bis 4h), für *pby-3* gefärbt und die jeweiligen Stadien der dynamischen Expression bestimmt (A bis D+). Gezeigt sind der absolute und der prozentuale Anteil an Embryonen in einem bestimmten Stadium zu den jeweiligen Zeitpunkten.

**Anhang 3: Die Sequenz des 8,2kb Fragmentes**

10	20	30	40	50	60
TCGACAAAGT	AAGAATTAGT	CATCTGCTTT	TCTTCTTTTT	ATCCAACATA	TTCTTTTAAG
70	80	90	100	110	120
CTATTTTTTT	AATTAAATTT	TAAAAGGATA	TAACCTAGTG	ACAAGTCTTC	AACTCTATAC
130	140	150	160	170	180
GACGAAATTT	ATTAAGATCT	TTTAGTTAAA	AGCAAAAAAT	CCAAAATCAT	AAATTTTTTT
190	200	210	220	230	240
CAAAAAATCA	GAAAACAGAA	CTAAAAATGC	TACACAGTAA	GGCTCAGCAA	ACGAAGATAT
250	260	270	280	290	300
TGAGAAAGAA	AGCTTTCATT	TAATATTGCT	TAGTATTTAT	GAAAAAATA	AAATATTAGT
310	320	330	340	350	360
ACGCAATACT	TTTGATCAAT	TGTTGTTTAA	TAAACATTTT	ACTCTTAGTT	AAAAAAAAT
370	380	390	400	410	420
ATTCCTATA	TTTTTATCTT	TTGGAACCTA	ACCCTATTTT	ATGTACTAGT	TCTTTGGTTC
430	440	450	460	470	480
GTCTAATATA	AATTCGCATA	ACGCGGCATT	TTAAAATAAC	ATATCGACCG	GGGGTTACCT
490	500	510	520	530	540
GTATCAGAAC	ATTATGTTTC	CGTGGCAAAT	CTTAATACAG	TGTTTTAAAT	TTTAGCTAAG
550	560	570	580	590	600
AATGCGCATA	TTTATTATCC	TAGAAGGACT	AAAAGAAAAT	TAAATGTGTG	AAAGTGGATT
610	620	630	640	650	660
TTCTTACACC	AAATTCTTAT	TAAAGAGCTT	TGAGACTGAA	ATTTATATCG	GACAAACTTT
670	680	690	700	710	720
GAACGGTAAG	GAGGCTAAAG	TCGGAATTTT	TTGGCAGAGA	ATTCCGATTT	TAGGTTCTCA
730	740	750	760	770	780
TTAAAAGTAT	CTCGAATGAA	TTGTGAAGAC	CCAATGTATC	TCAAAACTAA	AATAAAAAATA
790	800	810	820	830	840
AGATGAATTG	TAGGGCTAGA	TTTATTTAGT	ATCCAGTCAT	TAGCATGATA	GGAATGTTTA
850	860	870	880	890	900
CTACTGAAAT	AAATTTTCTT	CTGCATCGAT	AATCTCTTTT	ATTTATCTCT	TATATTTTGT
910	920	930	940	950	960
AGTCAATGAA	GAGAAGAAAT	AAAATAGTTT	GTTTTATCTT	CGATGACATA	TTTTCCTCAA
970	980	990	1000	1010	1020
ACACATCGAA	ATTGAACTTA	ACAGTGAGTT	TGTGTTAAAT	TTAAATAGAT	TATGAGTGCA
1030	1040	1050	1060	1070	1080
GTAAATGAA	CCGTATTAGT	AATTCTAACG	GGAAAAGATT	CTGGCATTTT	ATTCATGCT
1090	1100	1110	1120	1130	1140
TTTTTTTTTT	ATCTACTATT	TGTAAGTGGC	AAATAAAAAC	TATCCTTACA	GTCAGTTCAT
1150	1160	1170	1180	1190	1200
TTTCCTATTG	CTTCAGCTAT	TTATAAATAG	TTATCAATTT	TTCTAAAATT	AAAAATCATT
1210	1220	1230	1240	1250	1260
TTTTATTTTA	TTGAAACTAT	CTCACATAGT	ATATCGTTTC	TTTTTAAGAT	ATGTTCCCTT
1270	1280	1290	1300	1310	1320
GCTTGTTATA	GCACAATAAA	TTATTATATA	TGATATTTTA	TGGTAAAATA	TTTAGAACGA
1330	1340	1350	1360	1370	1380
CACACTGAGA	CATTTTCTCT	ATTGTAGTTA	TCAAGGTCTA	ACAATCCTCA	CAAAATGGAC
1390	1400	1410	1420	1430	1440
CTCCGCTAG	ATATGCATCA	CAACCAATA	TTAACACCAC	GTTGTATTTT	ATTAAATTAT

1450	1460	1470	1480	1490	1500
ACAAAGCACC	GATGAATCAT	ACATTGATTT	CTCTAGGACA	AAATTACCAC	AGTATGTGCC
1510	1520	1530	1540	1550	1560
AGGCTGCTTA	TTAAATGAAA	TTGCTCTGCT	GTGAAAAAG	AAAACGGTGA	GATGAAGTAT
1570	1580	1590	1600	1610	1620
GAAATCTGCC	ATATAAAAAA	AGTATGAGAA	TACAAAAATG	AATTAAGTTT	TTCTTTAAAT
1630	1640	1650	1660	1670	1680
ATTTTAAATA	GGAAAATTTC	ACCTGTTAGA	ATATTTTAC	TCAATGTTTT	CCATTAAAT
1690	1700	1710	1720	1730	1740
TTCAATTTCT	GGTTCCTGTA	TCTGTATCAA	AAAGGTTTTTC	CAAAAACCTT	TGTTGAATAT
1750	1760	1770	1780	1790	1800
CCCGAAATAC	ATTTCTCTAT	TCAGATAACT	TACAAACATA	CACAAACCTA	TATATACATA
1810	1820	1830	1840	1850	1860
AACATAAAGA	CATATACATA	TGTGAGTACG	AACATACGCA	TATGCCTACG	AACATAGAGG
1870	1880	1890	1900	1910	1920
CATATTCATA	TGCGTGTGTG	TACATTAAAT	TCGAAAACAA	AATTCTAACG	ATGTCCTGTTA
1930	1940	1950	1960	1970	1980
AAAATATTAA	AGCATTCCAA	CCTAATATAA	ATACTTGTTT	ATTTAGGCAT	AGATTTGAAC
1990	2000	2010	2020	2030	2040
TCTTCCCTGT	GTATAAAGAA	AAATACAGTT	TTAACTTTAT	GTATAACAAA	AGCAAAGATG
2050	2060	2070	2080	2090	2100
AAAAATTATC	TGATAATTAC	ATTAAATCA	CGCATTTAAA	ATCTCTAAAA	ATTACGTAA
2110	2120	2130	2140	2150	2160
ATTAATTCTG	ATGAAGAGAC	AAAGACGCTT	CGCTTTAGAA	AAACTTCATA	GACGCATTCC
2170	2180	2190	2200	2210	2220
ATAGGTTTAA	AAACAAGGAT	ACAACAAACA	AGCTCAACTT	GAAATGCATG	AATTAACCGT
2230	2240	2250	2260	2270	2280
CAAACTCCTT	CCTTTTCCAA	TTTCTAAAC	AACTTCGGTT	TATTTATTGG	CCTGTTAATT
2290	2300	2310	2320	2330	2340
TACGCTAATG	ATTTCAAATG	AAAAGGACAA	ACCTCAGATT	GGCAAAAATT	AATACGTTTT
2350	2360	2370	2380	2390	2400
TACCCCAGCG	GAGAGTCATA	AAATTCACTT	TACATCATTT	TCCGAAAACC	AGCTGCATTT
2410	2420	2430	2440	2450	2460
TTATCCTCAA	ACATCCATTT	ACCACCTGCA	AACACCCCTC	ACAATTGAC	CATTCCAGTC
2470	2480	2490	2500	2510	2520
CCTGAAAATT	CCTGCCTAGC	GGCTACCTGT	CTGATGATGC	GCTTTTGTGT	CAAAGCAACC
2530	2540	2550	2560	2570	2580
GACCACCCTC	CCCCGATCTT	TTATTCTTCT	TGACCTCCTG	GCCGAACGTT	CCTGGGGGAG
2590	2600	2610	2620	2630	2640
AGAGGGGGGA	CGGCACAACC	TGGGGGCCTC	CACCTTTCAT	TTTCATTGAG	CCTACCTTTT
2650	2660	2670	2680	2690	2700
CTGCTTTTTA	TCTCTCTTGA	CAATTGAGCT	GAGGGAAATT	TTTTCTTCCT	CCCAAGTTTC
2710	2720	2730	2740	2750	2760
CCACGACTTC	GAAGGTTTCG	AACTTGCAAC	CCCCTCCCCC	CTGATAATGG	TTCAGATTCC
2770	2780	2790	2800	2810	2820
ATTAACGTTT	CCATTGCCTT	CCCCTCCCCC	CTCTCTCTTT	CCACGCTTCG	CTAAGCCCTA
2830	2840	2850	2860	2870	2880
GTCCTTCCCC	TTGTAAGGAG	CTGGAGGGAT	TTTTTCAGACT	TCAGGTAACA	GTAATAGGGA
2890	2900	2910	2920	2930	2940
AAATTATTTT	TTAATAACTC	TTACACACTT	TAATCGTTGA	AAGTGAGTGA	GTGCAAAGGG
2950	2960	2970	2980	2990	3000
TGGACTCGAC	ATTTTTTACT	AAGAAGTAAT	GAATGCTGAA	TTTTTCGTAAA	TCATATTCCA

3010	3020	3030	3040	3050	3060
TTTAATGTAA	ATAATTTACC	TAACATAAAC	GTACAATTCT	TTAACGTTAG	TCCAGGCTAG
3070	3080	3090	3100	3110	3120
TATACTTTAA	TTTAAATGTC	ATGTATAAAT	ATGCTACTAT	ATTTTTTGGC	TTAGAACAGA
3130	3140	3150	3160	3170	3180
ATATTATGGT	CTTAAACAA	ATTTTTTTAA	ATTGCACTTA	CTTTCGGTAT	TCTTCAATAA
3190	3200	3210	3220	3230	3240
AAGTGGAATG	AAAACCTAAA	ATATTTTAA	CATTAAGAAA	AATGGAAAAT	TTATAAGCAT
3250	3260	3270	3280	3290	3300
TATCATCACT	AAATACATTA	TATAAGTGTA	TAATGCACAC	ATATATAATG	TACATTATAT
3310	3320	3330	3340	3350	3360
GTGTGTGTGT	GTGTGTACGC	AGCATATAAA	TCGCCATATG	CCGGAGATGT	ATACGAGATA
3370	3380	3390	3400	3410	3420
AATCTAGCTA	GATTATCTAT	ACCGTATGTC	AGAATATATA	GTGTACATTA	TATAGGCGTG
3430	3440	3450	3460	3470	3480
TTTATCCAAG	CAACATATAA	ATCACCATAT	TCCGGAGATA	TGCATATTTT	AGATTTATCT
3490	3500	3510	3520	3530	3540
CTTATACCTA	TCAATCAGAA	TAACTACGTT	ATTTTCATTT	TATTTCCACAT	GTATGTTAAT
3550	3560	3570	3580	3590	3600
TCAAAAAGTG	ATAAAATGTT	TAAGGAATAG	AATACCGTTT	CAAGCAATAT	TTTCTAAGAA
3610	3620	3630	3640	3650	3660
AAAGAAAGAC	TTGTTTTTTT	ATATAATAAA	TTATACTTAG	AATCTGTGAC	AGAACAAGTG
3670	3680	3690	3700	3710	3720
AGGTGCGAAA	AAATATTTTT	TAATCGACAA	TTAGGCAGTA	GTTTGTGAAA	TATATAAGGA
3730	3740	3750	3760	3770	3780
TTTATATTCC	AGGGATTAAA	AGTAAAATAT	AAGAAAACAC	AGACTGTAAT	TCTCAATGAA
3790	3800	3810	3820	3830	3840
CAAGTAGGTA	GAAATAAAGG	TTATTAACTT	ATATAACAAC	TGCAGAGTCA	GTATTTGATT
3850	3860	3870	3880	3890	3900
CATTTAGGTA	TCAGGGGTTG	TAAGTGATAT	TTAAAAATGA	TGCAAAACACA	TAAATTAAGC
3910	3920	3930	3940	3950	3960
TGAGTACAAA	TCGGAAAACC	AGACCGTATT	GCACAGCAAA	CTGAAACATT	CTAAAAACTG
3970	3980	3990	4000	4010	4020
CACAAGCTAA	TTCTGCATT	CATTTTATATC	TAATGAGTCA	AGATTGTAAT	CATTTCGTTAA
4030	4040	4050	4060	4070	4080
AATTAAAAAT	AATTCTGCAC	AAATGTCCCG	TAATTTTATC	GCAATATATC	TAAACTAATT
4090	4100	4110	4120	4130	4140
AAAGCAAAAT	CGACAAAATA	ACCAGTTTAT	ACATTCCCTTA	GGAAAAACAT	ATTCAGACCG
4150	4160	4170	4180	4190	4200
AATAAGAATA	AATGATTAAT	TAATTTAATT	TTATATTTAT	TGCTACAATT	TTACACTAAC
4210	4220	4230	4240	4250	4260
GGCATAGGCG	GTTACCATAA	ATTTCAAACA	CTGTATCCCC	CTACATCGTA	TGCTGAAAAA
4270	4280	4290	4300	4310	4320
CATAGAATGA	GGAACGTGT	TTATAAACGA	TTAACTTTGA	GGAGTAAAAG	ATAACAGAGT
4330	4340	4350	4360	4370	4380
AAATAATCAG	ATTAAATCTA	ATTAAACGCA	TTAAACTAAA	ATCTTTTATC	CCTCCGAAAC
4390	4400	4410	4420	4430	4440
AAAAATTAAG	TACGTCACAA	AATCAGATTT	CATTTTCTCT	CATTGATTGC	CTTACATTAC
4450	4460	4470	4480	4490	4500
TTCAGTTTAC	ATTCAATGAA	ACCGCAACAA	AATTAAATAC	TCCACTGAGA	TGAAACGCTT
4510	4520	4530	4540	4550	4560
TAATCCCCAT	CTTCCCCTA	TTCCCTACCG	CTTCTTCCAA	AAAATCCCTA	CTGCCATGTT

4570	4580	4590	4600	4610	4620
ACGTCTGCAG	GATAATAATT	TCTAACTACC	GGGTGTGTGC	CCCCCCCCCT	CCTCCGATGG
4630	4640	4650	4660	4670	4680
AGGGGGGAAG	CAAAATAGGC	GCGTGGGCAA	CTAACCCCT	CTTCCTCCAG	CTCTTTTTC
4690	4700	4710	4720	4730	4740
TCTGTAGTTG	TTTACATTAC	GTGCCCCTC	TTTAGTTCCT	TCCCTTTTCC	GAGGAAGGCG
4750	4760	4770	4780	4790	4800
GAGTTTTCCC	ACAGTGGAAA	ACGCATGCGC	TTTTCGATAG	GGGGAAAAAG	AAAAAAAAC
4810	4820	4830	4840	4850	4860
ACAGCGCCAC	GTGCTACTTT	GCGCGGCATA	TGTCGCGATT	TCGCGATTGC	AGGGGGAATC
4870	4880	4890	4900	4910	4920
TAATGGAGGG	GGGGAAGTTT	GAATGGTGGA	AGTAAGGTGA	ACGCTTAGTG	GTTGTGGCTG
4930	4940	4950	4960	4970	4980
AAAGATTTGG	CAACTTAGCA	CTCGCTTCGA	GTTATCTTTT	TCCAAGTGCA	TTCGTAACGT
4990	5000	5010	5020	5030	5040
ATTTTTTGAG	GGTTTTTTTT	TTTTTTGATA	AACACAAGTC	AGAATCGGGT	GCAAGAAATT
5050	5060	5070	5080	5090	5100
AGAAAAAAA	AAAAAGAAA	AAGAACTTT	AAAGTTGTGG	GGTATCATAG	TTTCCGTATC
5110	5120	5130	5140	5150	5160
ACTCAAATAA	AAATCATCAT	TGTGAAGATT	TCGTTTAAAA	TGATCAGTTC	TTAGTATAGA
5170	5180	5190	5200	5210	5220
TTAAAAGTAA	AAGAAATTAA	TATAATATTT	CGTGTGATTA	TATATCTCTT	AACAGAGTAC
5230	5240	5250	5260	5270	5280
AATTATTTTT	CTCAATGGCA	ATTTCACCAT	AATTCTTTAT	AGAAAGAATG	CTACATCATT
5290	5300	5310	5320	5330	5340
GGATCTCAGT	ATTATTTTTG	AGTCTTGCTT	TAAATGAGTG	TTCTTGTGCA	AATTTTAATC
5350	5360	5370	5380	5390	5400
CTTAAAAGTA	GTTAGATATT	TATTTGAAAG	GCCTTTTAA	AATTTTCTAG	CATTACGCAC
5410	5420	5430	5440	5450	5460
ACGCTAGAAA	TATTTTGATG	AAAAATAATT	ATGCAAAAGG	ATAAACAAAT	AATTTATTAA
5470	5480	5490	5500	5510	5520
TAAGTCAGTA	GATATTGTTT	ATAAGATATG	CTACTACTTA	ATACAACTAC	AATCATATGC
5530	5540	5550	5560	5570	5580
TTTATAAGCT	TATTTTATA	TCTAATCTTA	CAATTTTGTA	AGTCTGCATT	TCACAGAACT
5590	5600	5610	5620	5630	5640
ACAATGACGT	TTAAAGCATT	TTGATCATCA	CCACTTTGCC	TCGAAAAAAG	CAGATAATGT
5650	5660	5670	5680	5690	5700
TACATATCCA	GTAAATTTAT	TAAATATCCA	TGCACTGATA	GAATGATATA	TTTAAACACG
5710	5720	5730	5740	5750	5760
AGCTTAATTT	AAGAAATTTT	TTAAGGATCC	ACAGAAACCT	CCTGTTGTTA	TTATATTTAT
5770	5780	5790	5800	5810	5820
GTTCCGGTCG	ATTATCGAC	TTATCATTGT	TAAAAAACCG	AAGTGCTAAA	TAAATATTTG
5830	5840	5850	5860	5870	5880
TCCACATTAA	TGCATACCTT	AGTGACAGTG	CCTGCTGCAT	AAGTTTTTCC	AGCGATAATA
5890	5900	5910	5920	5930	5940
TCTATTGAAA	GAAAAAATAA	AACGCTGTT	GTTACTTAAG	GGACGCTTTT	CACTTGGTAT
5950	5960	5970	5980	5990	6000
AAAGATGCAG	TTACAGAAAA	AACTAACAC	ATGAAACCAT	TTCGTAACCTA	GTGGTACCTA
6010	6020	6030	6040	6050	6060
AACTAAGATC	AGTTACTTGT	TCGTCAAAC	TGTCATCGGT	TATTCATTAT	ACTATTTTAT
6070	6080	6090	6100	6110	6120
CTGTCTTAGA	GTTTGCACAA	TAAAGCGTAA	GGAAAACGGG	CGTTCAAAAC	ATTTATTTTT

6130	6140	6150	6160	6170	6180
TTCAGGTTTC	TTAAATGCAA	CTTGATCGTT	CAAGTTAATG	ATGCGTGAAG	CGACATGTTA
6190	6200	6210	6220	6230	6240
GATCAATTAA	CTCAATCTAA	TCGATATTTG	TCCAAAAGTA	ACTTGTTAAC	ATTACAATAC
6250	6260	6270	6280	6290	6300
TTAAAAGAAA	ATTTATGACT	AAATAATAAT	TAAAGGACAG	ATGATAAGCA	GTCAGAAGAT
6310	6320	6330	6340	6350	6360
ACTAATCTGA	TACTGCATGT	TTTATATCAG	AACTATTAAT	TTCTTGGCCT	GTTGTGTAAA
6370	6380	6390	6400	6410	6420
TACCAAAAAA	GAAAAGGTAT	ATTTAATGTT	GTACAATGAC	TTGTTTTTAA	CAAATATCTA
6430	6440	6450	6460	6470	6480
GAACTGAATT	TATCTCCTAA	CTTATGATGG	AAATAGTACA	GTTAATACCG	TTCTTGTCCTA
6490	6500	6510	6520	6530	6540
CAACAGATTT	TACCTTTCTG	TCTTAACGAT	CATGTATTAT	AACTCTATCA	CTAACTAGAA
6550	6560	6570	6580	6590	6600
AGTAGTGTA	TGGATGCGAT	CTAATGAGCT	CTTCTAGACT	AAACTTCACT	TTGAAAAGAA
6610	6620	6630	6640	6650	6660
TTTATTTACT	TCATTATTTT	TTTTCTCTCA	AGCTTATGAA	AAAAAAAAG	CTTTAAAAAC
6670	6680	6690	6700	6710	6720
TTCCCAGAAA	AACCTACTTT	ATAAGACACT	ACTAATTTTCG	CTTAATTAAT	AGACTTATTT
6730	6740	6750	6760	6770	6780
TTATGCTTAT	TCAAAATAAG	TATTTTAAAG	TAATAAAAAA	ATCATAATCC	ACCTATTGCC
6790	6800	6810	6820	6830	6840
AAATTCAGAA	AAATGAAAAA	AAAACAGATA	AAATTTTAAA	TCAAATTAT	TTATTTAATT
6850	6860	6870	6880	6890	6900
ACTCAATAAC	CAAATTTTTT	CAGTACCTCA	AAATGTTTAA	ATATTAAGCA	AACATCGATT
6910	6920	6930	6940	6950	6960
AAAAC TAGAC	ATAGTTTTGC	ATTTTAATTC	TAAAAGACCA	TCAAATAAA	ATAACATTCC
6970	6980	6990	7000	7010	7020
CCATTTTTTT	TCCCCCTAAA	TAGTAAATGT	GTTACAAAAC	ACAATCACTG	TCATGTGAAA
7030	7040	7050	7060	7070	7080
AAATTCAGT	CCTGACATGG	CATTGAACAT	CCTCCGCCAA	TTCTTCCCCG	CCAAGCTGTC
7090	7100	7110	7120	7130	7140
GTTGCGCCAA	ATGTCCCACC	TGTGTGCTGT	GTGCGTGCCG	CTCAAGTAAC	CCTGCAGCAA
7150	7160	7170	7180	7190	7200
GCCACATGTC	CGTCGCGAGC	CACAACTCGC	AAGGAGCCTT	CCGATTGGCT	GACGGGCCGT
7210	7220	7230	7240	7250	7260
GGGAAAGTGA	GGCTACACAC	GCTCTCAGGC	TCGCACAGGC	ACGGCTGGCT	GACCC TACCG
7270	7280	7290	7300	7310	7320
ATTATAACTG	GGAGCGCAAC	CTTCGAATTC	CCACACTTCA	GCCTCGGCTC	GCAAAC TGTT
7330	7340	7350	7360	7370	7380
AGCATCTCGC	TCACGCTCTC	TCCCTCGTTC	GATCCTTCAC	ATCGTGGAGT	ATTGGAATTT
7390	7400	7410	7420	7430	7440
TGTGTTTACA	TTTCGTTGTA	CGCTCAACTT	AAAATCATGC	CTTCTGAGAA	GACAGTTACG
7450	7460	7470	7480	7490	7500
AAGTGCACTG	AAACTCGAAG	GGTAGGTTGA	GTTTTATAAA	TATTTT TATT	GATATTTATT
7510	7520	7530	7540	7550	7560
GCATTACTGT	ATTTT TAGTG	ATTATATTTT	TCACCATTTT	TGTACTTGTA	ACTCAGTTGA
7570	7580	7590	7600	7610	7620
CTTATGATGT	TTTATTTTGT	CTTTGCAGGA	GTACAAAACC	TATAATGGAA	AAACGCAGAC
7630	7640	7650	7660	7670	7680
GGGCTCGAAT	CAACAACAGC	CTATCCGAAT	TAAAGAATCT	CATCTTGAT	GCATTA AAAA



```

      7690      7700      7710      7720      7730      7740
AAGATGTAAG TGTCAAAATT TGTGTGAATT TACTATTCAT NTAGATATTT AAAAGAACTA

      7750      7760      7770      7780      7790      7800
AATTTAATCA ATATTTGAAG AGTTAAAATT AATTCTCCGT ACTATTTAGT TAAAAAAAAA

      7810      7820      7830      7840      7850      7860
TTCACCTTAA TACAATTTAA TAAGAATAGT TTTCAACATA CTTTTAATTA TTTGTTGTTT

      7870      7880      7890      7900      7910      7920
ACATGTATGA CTTTGTGAATT GCTTGGAAGT TTAACTTAA TTCGATTTTC CTTTATTTTC

      7930      7940      7950      7960      7970      7980
TCTAGAATGC CCGCCACTCA AAAGTTGAAA AAGCTGACAT TTTGGAGATG ACTGTCAAAC

      7990      8000      8010      8020      8030      8040
ACCTGCAAAA TCTTCAGATG CAGCAACAAC AGCAACAGTT GACCCCAGAT CCATCCATGA

      8050      8060      8070      8080      8090      8100
TGGCCAAATT CCGTGCTGGT TTTGCTGAAT GTGCTAATGA AGTCAACAGA TTCATGGGCA

      8110      8120      8130      8140      8150      8160
GCATGGAAGG AATTGACCAC ACCATCCGCC AGAGACTCCT GAATCATCTT GCCAACTGCT

      8170      8180      8190      8200      8210      8220
TGACTGGCAT GAGCAACCCA CCTCCCACAC CCCTTCCTCC AGTTCATGTC CAGGTTTCAA

      8230      8240      8250
ATGATTCTCA AGAGACAGCT GCTACTCGAG T

```

Dargestellt ist die vollständige Sequenz des 8.2kb Fragmentes des genomischen *hairy* Klons. Neben den 7,4kb der „upstream“ *hairy* Sequenz wurden die ersten drei Exons sowie zwei Introns kloniert. Intron Nr. 1 umfasst die Sequenzen von bp 7462 bis 7590, Intron Nr. 2 beginnt bei bp 7688 und reicht bis bp 7924. bp: Basenpaare

**Anhang 4: Die Sequenz von *Krüppel-1***

2	GCGAAGCCAGAGAGAGGGGGTGAAGCGAGTTTCGGTCGTGTAGCCACGTAAACAAACAAG	61
62	AAGCCCCGCCGCAAGGGTTGGAGTGTGGAGTGAGGAGACGCGCTCTCTGTTGTTTGTGCC	121
122	GGAGGGAGCGCTCGCTTTTGTATTAAGAGACACTGTGTGATTGCGACAACTGCACGTGCA	181
182	CGCGAAGAGAGAGAGATACGGAATGGGGAAGTGAAGGAGTCTGGCTGTGTGTGATATGGC	241
242	GGCGGGAGCTGTCGTGAACAGAAGTGTGGAGAAAGAGAAGGTGAGCCCTACTAGGCTGGC	301
302	TGGAAGAAACGATGAAGGAAGGATCGGAGGGGGATGGCGGCGGTAGCAGTGATGATGTA	361
1	M K E G S E G D G G G S S D D V	16
362	CCGACTTCCAGGGATGCCGACAGTACCGTCTCCAACGGAGGAACCCACAGAATTGGAGCA	421
17	P T S R D A D S T V S N G G T H R I G A	36
422	GCTCCGGGAGGGTTGCCGCTCGGTGGAACGACCCTCGCGAACGCATTGCTGGGCATCACC	481
37	A P G G L P L G G T T L A N A L L G I T	56
482	TTGGACCGCGGCCAGCAAACGGAGGTTTCAAGGAGGAAATGGCGGCAACAGCAACAACAAC	541
57	L D R G P A N G G S A G N G G N S N N N	76
542	GTGCCCCACGTGGACGGTTTGTGTTTGAATTCACCTCGACAAGCGCCGCCAAAGGCGCGAAG	601
77	V P H V D G L F G I H S T S A A K G A K	96
602	GGTGGCGATAGTAACGGTCGCGACAAGTTATTCGTGTGCAACATCTGCCACCGGTCTCTTC	661
97	G G D S N G R D K L F V C N I C H R S F	116
662	GGATACAAGCACGTGTGTCAGAACCACGAGAGGACGCACACCGGAGAGAAGCCTTTTCGAG	721
117	G Y K H V L Q N H E R T H T G E K P F E	136
722	TGCAAGGAATGCCACAAGCGGTTTACACGTGACCACCACCTCAAGACACACATGCGTCTG	781
137	C K E C H K R F T R D H H L K T H M R L	156
782	CACACGGGAGAGAAGCCTTACCACTGTTCGCACTGCGAGCGTCAGTTTGTGCAGGTCGCC	841
157	H T G E K P Y H C S H C E R Q F V Q V A	176
842	AACCTGCGGAGGCATCTCCGCGTGACACGGGCGAGAGGCCCTACTCCTGCACGCTGTGT	901
177	N L R R H L R V H T G E R P Y S C T L C	196
902	CCCTCGCGCTTCTCGGACAGTAACCAGCTGAAGGCGCACCTCCTCATCCACGAGGGCAAG	961
197	P S R F S D S N Q L K A H L L I H E G K	216
962	AAGCCGTACGAGTGTCCCAAGTGCAACGGCCACTTCAGGCGGAGGCACCACCTCGTCCAC	1021
217	K P Y E C P K C N G H F R R R H H L V H	236
1022	CACAAGTGCCCCAGAGACGAGGCGAACATCGGCAAGCCGAGGCGTGGGCGACGGCCCCAAA	1081
237	H K C P R D E A N I G K P R R G R R P K	256
1082	GCGTACGAGGAGCTGCCCACCTTGCTGTGCGCGGTGTTGCAGGAGCGTCTGTGACGCCC	1141
257	A Y E E L P T L L S P V L Q E R L S T P	276
1142	GTCCCCGACCTGCCCCCGCCGCCACCACCACCGTGGCGGTGCGCCTCACGTCGGTCATC	1201
277	V P D L P P P P P P P V A V G L T S V I	296
1202	ACAAGAGGGCCCTCGCCGCCCTTGTTCGCAACCTGCACACATGCCATCCAGGAGGAAC	1261
297	T R G P S P P L V P Q P A H M P S R R N	316
1262	ACCCACCCCATGCACCACCCCTGCTAGGGCTAGGTGGTTCCAACGGGCGTTATCACCCA	1321
317	T H P M H H P L L G L G G S N G R Y H P	336
1322	GAACAGTCAGGGCCCTTGATATGACTGTGTCATCTGCCTCGGCGCCCGTCTCAGTCATC	1381
337	E Q S G P L D M T V S S A S A P V S V I	356

1382	GTACCGCTAGTAGCCTACAACCACCAGCACCACCGCGCCGCATGCTCCGTGGATGGTGTC	1441
357	V P L V A Y N H Q H H R A A C S V D G V	376
1442	CTCGACTTGTCCAATTTCGAGGAGCGACTCCGAGGCGGAACCCATCGAGGAGGAAGTGGAC	1501
377	L D L S N S R S D S E A E P I E E E V D	396
1502	GAAGAGGACGGCTGCGTTGACGAGGGCATCGATTCCGATAGCGACGAGGAGGAGGAGAG	1561
397	E E D G C V D E G I D S D S D E E E E E	416
1562	GAGCACCGCCTGCGCCTGCTTGCGTGCTCATGGAAACAAAGGGATGAATTGAGACACCGA	1621
417	E H R L R L L A C S W K Q R D E L R H R	436
1622	CCGGAGGACCTGAGGCGGCGGAGACCGATACGACGGCAGCGAAGGCGAAAACGGGGGA	1681
437	P E D L R R R G D R Y D G S E G E N G G	456
1682	AGCAACCAACTAGCATTACAGCTTACCACCACATCCTAGGAGACTGGATTCTTTTTTCTT	1741
457	S N Q L A L Q L T T T S *	470
1742	TTTCTTTGTCTCTAAACGTTTGTCTCGTCGAGTGATCGTCGCCACCAGTTCTTTGTTTTGAG	1801
1802	CCGTTTTCAACTCAGAAAAGAAAAAGAGAGAGCAGAATGGGCTTCTTTTGCAACGTCTAT	1861
1862	CGCTAAGTTCTTTATCACATTCCGTTTCTTGCTCCAGTAAAAGCTCTTTAAATCTAAAAA	1921
1922	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	1947

Dargestellt sind sowohl die Nukleotid- als auch die Aminosäuresequenz von *Krüppel-1*. Die 1947bp enthalten einen ORF von 468aa. Der Stern symbolisiert ein Stop-Codon. aa: Aminosäure, bp: Basenpaare, ORF: offenes Leseraster.

**Anhang 5: Die Sequenz von *Krüppel-2***

1	GGGGACGAAAGATCTGAGACGGATACCTACTCTAAAGGAGTTTGTGAGAGGCGTATGTTT	60
61	TGATGGCTGATTTTTTCAGGCAATTTTTTCACGTTTCGCGCTATCGGCTGTTTCCAGAGAC	120
121	CCAAATTGCTGTAAATCGCAGAAATCGACCGCACTGGGCATTTGATTGCGCCAGTGTGTA	180
181	TGGAGTTCACCTAAACAAGATTGAGTTTCCCAGAAGAAATTTTTCAAGAAGCGTTGGTGA	240
241	CCTTCGAAATAAGATGAAGGGGCGTACGCGGGTTCAGAATGTTTTCCGGAGCCACTGACC	300
301	ATGCAGATGGGCCACCGCCACTGCGACATGACTGTCTGGAGGAATCAAAATCTCAGATGTA	360
361	GCCTTCAAGGTGGATCGAAAAAAGAGTTAGCCGTGGCCGCCGAGAATGAAGGACGGGTTG	420
1		M K D G L 5
421	GAGGTAGCGGAAGGAGTAAGAACGGCCAGCAGCGCCACCAACGGCGACAAGTGCGACGCC	480
5	E V A E G V R T A S S A T N G D K C D A	25
481	ATGCGACCCCTGGACGAGCAGAGAACGACGGGTAACGGCCTCGACATCGACACCCTGCCG	540
25	M R P L D E Q R T T G N G L D I D T L P	45
541	GGCAACGGGCCACCGGCTACCAAGAATGGTGCGGGCGCCAGAAAAATGGGGCGTCCGAC	600
45	G N G P P A T K N G A G A Q K N G A S D	65
601	AAGGCCTTCACATGCAGCATCTGCAACCGACAGTTCGGCTACAAGCACGTCCTCCAGAAC	660
65	K A F T C S I C N R Q F G Y K H V L Q N	85
661	CACGAGCGCACGCACACCGGCGAAAAGCCCTTCGAATGTCCCGAGTGCCACAAACGCTTT	720
85	H E R T H T G E K P F E C P E C H K R F	105
721	ACTCGGGACCACCACCTCAAGACGCACATGCGGTTGCACACTGGGGAGAAGCCCTACCAG	780
105	T R D H H L K T H M R L H T G E K P Y Q	125
781	TGTCCCCACTGTGACCGTCACTTCGTGCAGGTGGCCAATCTCCGACGTCATTTACGCGTG	840
125	C P H C D R H F V Q V A N L R R H L R V	145
841	CATACAGGCGAGAGACCCCTACGCCTGCACCCCTTTCGAGTCTCGTTTCTCTGACAGCAAC	900
145	H T G E R P Y A C T L C E S R F S D S N	165
901	CAGCTCAAGGCCCATGACTTAATTCACCGGGGTGAGAAGCCTTTCCAGTGTACCGAATGT	960
165	Q L K A H D L I H R G E K P F Q C T E C	185
961	TGCGGCAGGTTCCGGAGAAGGCGTCATCTCATCCACCACAAGTGTCCTCCAAAGACGAGTCC	1020
185	C G R F R R R R H L I H H K C P K D E S	205
1021	AACTTGGGAAAGCCCAGGCGAGGAAGAAGGCCGA	1054
205	N L G K P R R G R R P	215

Dargestellt sind sowohl die Nukleotid- als auch die Aminosäuresequenz von *Krüppel-2*. Die 1055bp enthalten einen ORF von 215aa. aa: Aminosäure, bp: Basenpaare, ORF: offenes Leseraster.

**Anhang 6: Die Sequenz von *Su(H)***

1	AAGCTTGATCACGCAAAAGTGGCCCAGAAATCCTATGGGAATGAAAAGAGATTCTTTTGC	60
1	K L D H A K V A Q K S Y G N E K R F F C	20
61	CCACCGCCTTGCAATTTATTTGTTGGGAGATGGATGGAGGAGGAAACAAGAACAGATGGTA	120
21	P P P C I Y L L G D G W R R K Q E Q M V	40
121	CGTGAAGGTGAAAACGAACAAGGCTCCCATTATGTGCCTTTATTGGCATTGGTAATTCT	180
41	R E G E N E Q G S H L C A F I G I G N S	60
181	GAGCAAGATATGCAACAGCTGGACTTCAATGGCAAGAAGTATTGTGCTGCAAAGACGCTT	240
61	E Q D M Q Q L D F N G K N Y C A A K T L	80
241	TTTATCAGTGATTCTGACAAGCGTAAACATTTTATGCTGTCAGTAAAGATGTTCTATGCA	300
81	F I S D S D K R K H F M L S V K M F Y A	100
301	AATGGAGAAGATCTTGGGATGTTTCAAAGTAAAGAATCAAAGTTATTTCTAAGCCTTCA	360
101	N G E D L G M F Q S K R I K V I S K P S	120
361	AAAAAGAAGCAGTCCCTGAAAAATGCTGATTTATGCATTGCCTCTGGTACGAAAGTTGCT	420
121	K K K Q S L K N A D L C I A S G T K V A	140
421	TTGTTTAAATCGCCTACGTTTCAAAACAGTTAGTACTCGCTATCTTCATGTGGAAAATGGA	480
141	L F N R L R S Q T V S T R Y L H V E N G	160
481	AATTTCCATGCTAGTTCAACTCAGTGGGGTGCCTTCACTATTCATTTATTGGATGACAAT	540
161	N F H A S S T Q W G A F T I H L L D D N	180
541	GAGTCAGAATCTGAAGAATTCAGTGTACGAGATGGATATATTCATTATGGTTCAACTGTA	600
181	E S E S E E F T V R D G Y I H Y G S T V	200
601	AAACTTGTTTGTTCAGTCACTGGCATGGCCCTACCTAGACTGATTATTCGTAAGTAGAC	660
201	K L V C S V T G M A L P R L I I R K V D	220
661	AAA	663
221	K	

Dargestellt sind sowohl die Nukleotid- als auch die Aminosäuresequenz von *Su(H)*. Die 663bp enthalten einen ORF von 221aa. aa: Aminosäure, bp: Basenpaare, ORF: offenes Leseraster.

**Anhang 7: Die Sequenz von *Fringe***

1	GCCCCGGGGGAGCTCCAGCTGCCATAGCTATTTCGAACTATGAGTGATATCCCCGAGCTCG	60
1	A R G G A P A A I A I R T M S D I P S S	20
61	CCTCAGGAGGATTGGTACCTTGGCAAGCCCAGCATTTCGGTCTCCCCTTGAAATTATTTGT	120
21	P Q E D W Y L G K P S I R S P L E I I C	40
121	CGTGATGAAAAACAGAAAAATATTTTCCTTTTGGTTTGCTACTGGTGGAGCAGGATTTTGT	180
41	R D E K Q K N I S F W F A T G G A G F C	60
181	ATTAGCCGAGCTTTAGCATTAATAATGTTACCTATTGCTAGTGGTGGTAAATTTATTAGT	240
61	I S R A L A L K M L P I A S G G K F I S	80
241	ATTGGAGAAAAATTCGTCTGCCAGATGATGTTACCATGGGATACATAATTGAACATATT	300
81	I G E K I R L P D D V T M G Y I I E H I	100
301	TTGAAAAAGAACTAACTGTTGTGCGACCAGTTCATTCTCATTTTGAGCCCATGAAATTT	360
101	L K K K L T V V D Q F H S H F E P M K F	120
361	TTGAAACCTGATACTTTTCTGATCAGATATCATTAAAGCTATTCAAGATTGCGCATGAA	420
121	L K P D T F S D Q I S L S Y S R F G H E	140
421	ATGAATGTGTTGCAAATTGATGGCTTTGACCAAAGATAAGATCCTACAAGGTTTTTGTCT	480
141	M N V L Q I D G F D Q R *	153
481	CTGCACTGTTATTTATTTCCCAACTTCAGCTTTTGTCCAAATTGATGGATTGATGGTCGA	540
541	TAGAAAAAATTGAATTTACCTGGTTCAAATATTTGTACTTTATTGAAAATATATAAATT	600
601	TCTAATTAAATTTGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCGCCGCTGAATTCTACC	660
661	TGCCCCGGGCGGCC	673

Dargestellt ist die 3' RACE Sequenz von *Fringe*. Die 673bp enthalten einen ORF von 152 aa sowie 218bp des 3'UTR. Der Stern symbolisiert ein Stop-Codon. aa: Aminosäure, bp: Basenpaare, ORF: offenes Leseraster, UTR: nicht kodierenden Region.

## Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die molekularen Segmentierungsmechanismen der Spinne *Cupiennius salei* zu untersuchen, um so funktionell konservierte und divergente Aspekte der Arthropoden Segmentierung zu bestimmen und Aussagen über die Evolution des Segmentierungsprozesses zu ermöglichen. Hierbei wurden die Expressionsmuster verschiedener *Cupiennius* Paar-Regel und Gap Gen Homologe untersucht und funktionelle Analysen dieser Gene durchgeführt. Zudem wurde auch die Rolle der Notch-Signalkaskade während der Spinnen Segmentierung untersucht, um mögliche Gemeinsamkeiten mit dem Segmentierungsprozess der Vertebraten zu bestimmen.

Die vorliegenden Ergebnisse zu den Paar-Regel und Gap Gen Homologen der Spinne lassen vermuten, dass die aus *Drosophila* bekannte Segmentierungsgenkaskade nicht vollständig konserviert ist. So konnte für die *Cupiennius Krüppel* Gene keine klassische Gap Funktion nachgewiesen werden. Im Fall des Paar-Regel Gen Homologs *pairberry-3* lassen die Daten darauf schließen, dass die Segmente des Opisthosomas einzeln von der Wachstumszone abgespalten werden. Somit scheint zumindest für das Opisthosoma kein doppel-segmentaler Mechanismus vorzuliegen.

Eine wichtige Rolle beim Segmentierungsprozess der Spinne übernimmt die Notch-Signalkaskade. Diese ist nicht nur an der Etablierung der Segmente sowie deren Grenzen beteiligt, sondern reguliert auch die dynamische Expression des *Cupiennius* Paar-Regel Gen Homologs *hairy*. Obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Beteiligung der Notch-Signalkaskade an der Segmentierung der Spinne und der Vertebraten auf ein unabhängiges Rekrutierungsereignis zurückzuführen ist, liefern diese Ergebnisse doch einen starken Hinweis auf einen gemeinsamen Ursprung des Segmentierungsprozesses.

## Summary

The aim of the present work is to study the molecular segmentation mechanisms of the spider *Cupiennius salei* in order to gain more insights into functionally conserved and divergent processes of arthropod segmentation. This is a prerequisite for the comparison of the segmentation process in arthropods with metamerisation processes of other phyla including vertebrates. The expression patterns of different *Cupiennius* pair-rule and gap gene homologues were analyzed and functional studies were done using the RNAi approach. In addition the role of the Notch signaling pathway in spider segmentation was studied.

The results of this study suggest that not all levels of the *Drosophila* segmentation gene cascade are conserved in the spider. For instance the *Krüppel* genes seem not to act as classical gap genes during spider segmentation. Furthermore it is not clear whether a double-segmental pair-rule mechanism exist for the spider. The expression pattern of the pair-rule gene homologue *pairberry-3* indicates that at least the segments of the opisthosoma form one by one in a single segment fashion.

The Notch signaling pathway is involved in the segmentation process of the spider. Genes like *Notch*, *Delta* or *Suppressor of Hairless* are necessary for the formation of segments, the segmental boundaries and the organization of the dynamic *hairy* expression.

The involvement of the Notch signaling pathway in spider segmentation could be due to a convergent recruitment of Notch signaling. However Notch signaling being involved in both spider and vertebrate segmentation is a strong argument in favor of a common origin of the segmentation process.



## Erklärung

„Ich versichere, dass die ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch an keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Diethard Tautz betreut worden.“

Köln, September 2003

Michael Schoppmeier

## Teilpublikationen:

Stollewerk A., Schoppmeier M. and Damen W.G.M. (2003). Involvement of *Notch* and *Delta* genes in spider segmentation. *Nature* 423, 863-865.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Michael Schoppmeier

Geboren am: 25.10.1973

Geburtsort: Köln

Nationalität: deutsch

Familienstand: verheiratet

- |                      |  |
|----------------------|--|
| 1980-1984            | Besuch der Gemeinschaftsgrundschule Lindenbornstrasse in Köln  |
| 1984-1993            | Besuch des Gymnasiums Kreuzgasse in Köln   |
| 1993                 | allgemeine Hochschulreife  |
| 1993-1994            | Zivildienst an den Medizinischen Einrichtungen der Universität zu Köln   |
| 1994-2000            | Studium der Biologie an der Universität zu Köln  |
| 1999                 | Sechswöchiges Praktikum am Zoologischen Institut der Universität München in der Abteilung für Molekulare Evolution   |
| 1999-2000            | Anfertigung der Diplomarbeit:<br>„Doppelstrang RNA vermittelte Gen-Interferenz (RNAi) für die Spinne <i>Cupiennius salei</i> : Etablierung einer Methode zur funktionellen Analyse der an Entwicklungsprozessen beteiligten Gene“. Am Institut für Genetik der Universität zu Köln, Abteilung für Evolutionsgenetik. |
| September<br>2000    | Diplom in Biologie   |
| seit Oktober<br>2000 | Doktorarbeit am Institut für Genetik der Universität zu Köln<br>in der Abteilung für Evolutionsgenetik unter der Leitung von Prof. Diethard Tautz im Labor von Dr. Wim Damen.  |
| 2001                 | Teilnahme am „TMR in Evolutionary Biology“ vom 13. Mai bis 16. Juni an der „Station Biologique de Roscoff“ in Frankreich   |
| 2002                 | Teilnahme am GFE-Kurs „4. GFE School- Novel Approaches to Developmental Biology“ vom 10. bis 12. Oktober in Güzburg  |

## Publikationen :

Schoppmeier M. and Damen W.G.M. (2001). Double-stranded RNA interference (RNAi) in the spider *Cupiennius salei*: the role of *Distal-less* is evolutionary conserved. *Dev. Genes Evol.* 211, 76-82.

Stollewerk A., Schoppmeier M. and Damen W.G.M. (2003). Involvement of *Notch* and *Delta* genes in spider segmentation. *Nature* 423, 863-865.